

Aus der Elisabeth-Klinik Bigge
Fachklinik für Orthopädie und Rheumatologie
Leiter: Professor Dr. Dr. Axel Wilke
In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



**Tissue Engineering von Knochen beim Chinchilla
Bastard Kaninchen unter besonderer
Berücksichtigung der flat panel
Volumencomputertomographie:
Eine Pilotstudie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
Dr. med.
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julian Hägele
aus Bielefeld

Marburg, 2010

1. Dezember 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Phillips-Universität Marburg am: 16.12.2010

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Axel Wilke

Korreferent: Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Fragestellung	12
3	Material und Methoden	15
3.1	Versuchstiere	15
3.2	Implantate	16
3.2.1	Unbesiedelte Scaffolds	16
3.2.2	Besiedelte Scaffolds	18
3.3	Einsetzen der Scaffolds	19
3.3.1	Osteosynthesematerial	19
3.3.2	Operation	21
3.4	Radiologische Kontrollen	24
3.4.1	Nativröntgen	25
3.4.2	Volumen-Computertomographie (fpvCT)	26
3.5	Ende der Versuchszeiträume	27
3.5.1	Euthanasie	27
3.6	Herstellung der histologischen Präparate	27
3.6.1	Schneiden, Entwässerung und Entfettung	28
3.6.2	Einbettung	29

3.7	$\mu - CT$	30
3.8	Herstellung der histologischen Präparate	30
3.8.1	Vorbereitung	31
3.8.2	Das Trenn-Dünnschliff System	31
3.8.3	Färben des Dünnschliffs	33
3.8.4	Histologische Auswertung	34
3.9	Datenauswertung	34
4	Ergebnisse	36
4.1	Verlauf des Versuchs	36
4.1.1	Vorversuche	36
4.1.2	Versuchsgruppen	37
4.2	Projektionsradiographie	38
4.2.1	Scaffoldnachweis	38
4.2.2	Osteosyntheseinsuffizienz	39
4.2.3	Wachstum des Knochens	39
4.2.4	Zusammenfassung	41
4.3	fpvCT	41
4.3.1	Verlauf	42
4.3.2	Darstellungsmöglichkeiten und Artefakte	43
4.3.3	Osteosynthese	45
4.3.4	Scaffold	48
4.3.5	Gefäßversorgung	51
4.3.6	Heilungsprozess und Knochenwachstum	52
4.3.7	Zusammenfassung	58
4.4	$\mu - CT$	58
4.4.1	Scaffold	58
4.4.2	Knochenwachstum	60

4.4.3	Zusammenfassung	62
4.5	Histologie	62
4.5.1	Besiedelte Scaffolds	63
4.5.2	Degradation der Scaffolds und Knochenwachstum	63
4.5.3	Zusammenfassung	65
5	Diskussion	68
5.1	Auswertungsmethoden	68
5.1.1	Projektionsradiographie	68
5.1.2	fpvCT	69
5.1.3	$\mu - CT$	72
5.1.4	Histologie	73
5.1.5	Zusammenfassung	74
5.2	Versuchsaufbau	75
5.2.1	Tiermodell	75
5.3	Operation und Osteosynthese	77
5.3.1	Osteosyntheseversagen	78
5.3.2	Einfluss der Osteosynthese auf die Knochenheilung	81
5.3.3	Zusammenfassung	85
5.4	Wachstum und Scaffolds	86
5.4.1	Besiedelte vs. unbesiedelte Scaffolds	86
5.4.2	Degradation	87
5.4.3	Lufteinschlüsse und Infektionen	89
5.4.4	Gefäßproliferation	90
5.4.5	Periostales Wachstum	90
5.5	Non-Union	91
6	Folgerung	93

Tabellenverzeichnis	95
Abbildungsverzeichnis	96
Literaturverzeichnis	98
Danksagung	108
Verzeichnis der akademischen Lehrer	110

1

Einleitung

Bei Verletzungen des Knochens kommt es meist zu einer spontanen Heilung mit minimalem Behandlungsaufwand. Ein Teil der Frakturen heilt aber nicht komplikationslos ab und bedarf weiterer Therapie. Gründe hierfür können unter anderem ungenügende Fixierung, metabolische Störungen, mangelnde Blutversorgung und Infektionen sein. Ein weitere Ursache ist der Verlust von Knochenmasse. Diese Situation stellt insbesondere dann eine große therapeutische Herausforderung dar, wenn der Defekt eine kritische Größe erreicht und der Knochen diese Lücke nicht mehr selbstständig schließen kann. Neben Verletzungen können auch Missbildungen, Gelenkersatzoperationen und die Behandlung von Tumoren und Osteomyelitis zu solch kritisch großen Defekten führen und rekonstruktive Chirurgie nötig machen.

Materialien, mit denen diese Defekte geschlossen werden sollen, erfüllen idealerweise vier Voraussetzungen: Sie müssen biokompatibel sein, sind osteogen, osteoinduktiv und osteokonduktiv [13, 34]. Diese Eigenschaften müssen jedoch gesteuert werden, da eine Erschöpfung der körperlich Ressourcen zum Beispiel durch eine übermäßige Rekrutierung von Stammzellen für den Gesamtorganismus schädlich

sein kann.

Osteogen bedeutet fähig zu sein, selbstständig Knochen zu bilden. Dies können nur lebende Osteoblasten. Veranlassen Stoffe (z. B. Bone Morphogenetic Proteins) oder Materialien Zellen sich in knochenbildende Osteoblasten zu verwandeln sind sie osteoinduktiv. Diese Differenzierung ist aber nur möglich, wenn sich die mesenchymalen Vorläuferzellen im Wundbett befinden. Osteokonduktiv ist ein Gerüst, dass von knochenbildendem Gewebe benutzt werden kann, um daran Knochen anzulagern (Leitschienenprinzip).

Momentan ist es nur die autologe Knochenspende, die alle diese Voraussetzungen erfüllt. Die autologe Knochentransplantation liefert neben den oben genannten Vorteilen die besten Ergebnisse und ist seit Jahren der Goldstandard in der rekonstruktiven Chirurgie. Diese Methode ist aber mit Nachteilen verbunden. Aufgrund der begrenzten Menge an gewinnbarem Material ist die Indikationsstellung eingeschränkt [69], auch schwankt die Qualität der Transplantate. Oft kommt es zu postoperativen Hämatomen im Bereich der Entnahmestelle und Brüchen des Beckenkamms („donor site morbidity“). Auch scheint es so, als würden die Patienten einer höheren Schmerzbelastung ausgesetzt und die Operationszeit ist meist deutlich verlängert [58].

Eine Alternative kann die allogene Knochenspende sein. Die Operationszeit wird praktisch nicht verlängert und „donor site morbidity“ stellt keine Komplikationsmöglichkeit dar. Doch sind hier die Ergebnisse nicht so gut wie bei autologer Knochenspende und es besteht die Gefahr von Immunreaktionen und Übertragung von Krankheiten. Außerdem ist die Nachfrage nach allogenen Knochenimplantaten weitaus größer als das Angebot.

Als dritte Möglichkeit neben der autologen und allogenen Knochenspende sind Metalle und Keramikgerüste erforscht worden. Diese Stoffe bieten sich an, da sie eine hohe Festigkeit aufweisen und häufig gut verträglich sind. So können sie dem Defekt eine sofortige Stabilität geben. Auf der anderen Seite kann diese hohe Stabilität einen großen Nachteil haben: Dadurch, dass das Implantatmaterial den Großteil der Belastung trägt, kommt es unter Umständen kaum noch zur mechanischen Stimulation des Knochens und dieser bildet sich oft sogar zurück („stress shielding“ [50]). Dazu kommt, dass Keramiken spröde und nicht sehr dehnbar sind und deswegen nur an Stellen eingesetzt werden können, an denen keine starken Torsions-, Biege-

oder Abscherkräfte auftreten [69].

Eine geeignete Alternative zur autologen oder allogenen Knochenersatztherapie ist noch nicht gefunden. Die Notwendigkeit für eine schnell verfügbare, einfach anwendbare, komplikationsarme und günstige Methode zur Knochenersatztherapie ist jedoch hoch. In unserer alternden Bevölkerung wird die Zahl von 450 000 Knochenersatztherapien pro Jahr allein in den USA, sicherlich weiter steigen [50]. Neben dem deutlichen Verlust an Lebensqualität sind auch die sozioökonomischen Konsequenzen der langwierigen und oft frustrierten Behandlung dieser Patienten von großer Bedeutung [68]. Eine mögliche Lösung dieser Probleme könnte im Bereich des Tissue Engineering liegen.

Tissue Engineering von Knochen hat seit Anfang der neunziger Jahre eine rasante Entwicklung genommen [79]. Einer der wichtigsten Ansätze ist die scaffold-basierte Überbrückung eines knöchernen Defekts in vivo. Hierfür wurden Scaffold-designs aus unterschiedlichsten Materialien und verschiedene Herstellungsmethoden entwickelt [48, 50, 55, 68, 46, 69]. Die vielversprechendsten Ansätze sind Scaffolds aus Polymeren [73, 27, 45, 52, 53, 65, 74], bioaktiven Keramiken und Gläsern [43] und Mischformen aus beiden Gruppen (sogenannte „composites“) [31, 38, 51, 67, 86, 85]. Zur Verbesserung ihrer Eigenschaften wurden diese Trägergerüste u.a. mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (z.B. Bone Morphogenetic Proteins (BMP) [5, 4, 9], Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [44, 77]), Stammzellen oder Osteoblasten beschichtet bzw. besiedelt.

Um aber für das Tissue Engineering von Knochen beim Menschen geeignet zu sein, müssen alle diese Gerüste eine Vielzahl von Voraussetzungen erfüllen. Als erstes steht hier die Biokompatibilität, das Material sollte weder eine Entzündungsreaktion auslösen noch immunogen oder zytotoxisch sein. Idealerweise sollte es - wie die autologe Knochen spende auch - osteogen, osteoinduktiv und osteokonduktiv sein. Osteogenität kann aber nur durch Besiedlung des Scaffolds mit knochenbildenden Zellen und Osteoinduktivität nur durch das Vorhandensein von Differenzierungsfaktoren und Vorläuferzellen erreicht werden. Man nimmt an, dass für optimale Osteokonduktivität und Vaskularisierung das Scaffold eine Makroporosität von 90% und eine Porengröße von 10-100 μ m aufweisen sollte [43, 67].

Des Weiteren sollte das Scaffold problemlos formbar sein, es darf während der intraoperativen Handhabung nicht kollabieren und muss stabil im Wundbett lie-

gen. Die Degradation darf nicht zu schnell und nicht zu langsam erfolgen und es dürfen keine toxischen Abbauprodukte frei werden. Für den regelmäßigen klinischen Gebrauch muss der Herstellungsprozess reproduzierbar, kontrollierbar und nicht zu teuer sein. Und über allem muss das Scaffold einfach zu sterilisieren sein.

Verschiedene Probleme können bei den der Scaffoldentwicklung folgenden in vivo Versuchen auftreten: Es kommt zum Beispiel auf Grund mangelnder Gefäßproliferation zu zentralen Nekrosen, andererseits kann es beim Einsatz von BMPs zu Gefäßfehlbildungen kommen. Das Scaffold degradiert schneller oder langsamer als der Knochen einwachsen kann und kann dann entweder als Leitstruktur fehlen oder den Knochen beim Wachstum behindern. Im ungünstigsten Fall schrumpft das Scaffold sofort nach Implantation in vivo und ist damit unbrauchbar. Außerdem ist die Osteosynthese ein entscheidender Faktor, der den Erfolg der in vivo Anwendung bestimmt.

Der Erfolg von Tissue Engineering von Knochen wird also von vielen Variablen bestimmt. Dies macht einen Versuchsaufbau nötig, in dem im besten Fall die Entstehung eines im Menschen anwendbaren Konzepts zur Knochenersatztherapie in einem Projekt vom ersten Schritt - der Entwicklung des Scaffolds - bis zur klinischen Erprobung verfolgt werden kann, so dass möglichst viele dieser Variablen überblickt und kontrolliert werden können. Ein besonderes Augenmerk muss auf die Etablierung eines geeigneten Tierversuchmodells gerichtet werden, um eine Vergleichbarkeit verschiedenener Ansätze sicherzustellen.

Im Rahmen unseres Projektes wurde ein Composite-Scaffold aus dem Polymer Polylactid-co-Glycolid-Acid (PLGA) und Kalziumphosphat entwickelt und eingesetzt, mit allogenen mesenchymalen Stammzellen im Festbett-Perfusions-Bioreaktor besiedelt oder unbesiedelt im Tierversuch erprobt. Als Tierversuchsmodell wurde das Konzept des „Critical size defects“ (=Defekt kritischer Größe) im Femur des Weißen-Neu-Seeländer-Kaninchens zu Grunde gelegt.

Zuerst für die Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie von Schmitz und Hollinger [35, 72] entwickelt, ist der Defekt kritischer Größe definiert als der kleinste Defekt im Knochen eines Tieres, der nicht mehr selbstständig durch knöchernen Durchbau geheilt wird. Es kommt also zu einer Pseudarthrose, die ohne Intervention für den Rest des Lebens bestehen bleibt. Im idealen Fall führt aber der Einsatz des wie auch immer gearteten Knochenersatzmaterials zum Schluss des Defekts kritischer Größe

und es kann so die Wirksamkeit des Knochenersatzmaterials gezeigt werden.

Der Defekt kritischer Größe im Femur des Weißen-Neuseeländer-Kaninchens und des Weißen-Japanischen-Kaninchens wurde von Concannon, Inui und Fialkov ermittelt. Concannon und Inui [10, 39] postulierten eine Defektgröße von 10mm bzw. 20% der Femurlänge als ausreichend für einen Defekt kritischer Größe. Fialkov et. al. [20] fanden jedoch heraus, dass 10mm nicht ausreicht und stattdessen 12mm als Defektgröße notwendig sind. Ein weiterer entscheidender Punkt für das Generieren eines Critical size defect ist das Periost: Schon früh haben Untersuchungen gezeigt, dass das Periost eine entscheidende Rolle in der Überbrückung von knöchernen Defekten spielt. Narang und Laskin [56] zeigten, dass ein 12mm langer Defekt in der Tibia von Holtzman Albino Ratten ohne vorheriges Entfernen des Periosts kein Defekt kritischer Größe war, wenn jedoch das Periost entfernt wurde, erfüllte schon ein Defekt von 6mm die Kriterien des Defekts kritischer Größe. Es konnte gezeigt werden, dass das Periost, aber auch das Endost eine Quelle von osteogenen mesenchymalen Stammzellen ist [25, 84].

Ziel des Projektes war es herauszufinden, ob die besiedelten und/oder unbesiedelten Scaffolds zu einem Überbrücken des Defektes mit funktionell belastbarem Knochen führen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden vier Untersuchungsmethoden gewählt: Bei allen Versuchstieren wurden post-mortem eine Histologie und ein μ -CT des Femurdefektes durchgeführt. Als Verlaufskontrollen wurde bei der Gruppe mit unbesiedelten Scaffolds normales Projektionsröntgen und bei der Gruppe mit besiedelten Scaffolds eine flat-panel-volumetric-Computer-Tomography (fpvCT, Volumen-CT) durchgeführt. Dieses Verfahren erlaubt die hochauflösende dreidimensionale Darstellung von Knochen in vivo und damit eine sehr interessante Alternative, die Knochenheilung beim scaffoldbasierten Tissue engineering im Zeitverlauf in vivo darzustellen [60].

2

Fragestellung

Tissue Engineering von Knochen ist ein vielversprechendes Verfahren zur Überbrückung von großen knöchernen Defekten. Trotz einer Vielzahl von Forschungsprojekten und einigen vielversprechenden Ansätzen sind noch viele Fragen unbeantwortet. So ist es oft unklar, warum es nicht zum Schluss eines Defektes und damit zu einer Pseudarthrose kommt. Viele wesentliche Faktoren sind bekannt (siehe Kapitel 1, Seite 10). Eine entscheidene Frage konnte bis jetzt aber nur unzureichend beantwortet werden: Was geschieht während des Heilungsprozesses beim scaffoldbasierten Tissue engineering von Knochen in vivo?

Um den Erfolg und die Anwendbarkeit unseres Konzeptes zu überprüfen mussten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Operation und Osteosynthese
 - Welche Aussagen lassen sich über Osteosynthesestabilität und Folgen eventueller Instabilitäten treffen?
2. Scaffold

- Können die Scaffolds in vivo dargestellt werden?
- Liegen sie postoperativ korrekt im Osteotomiespalt an den Osteotomiekannten des Femurs?
- Schrumpft das Scaffold nach dem Einsetzen?
- Wie ist das Degradationsverhalten der Scaffolds und wie kann man die Bildung von Knochenmatrix im Implantat von der Kalziumphosphatphase des Scaffolds unterscheiden?
- Gibt es Unterschiede im Degradations- und Einwachsverhalten zwischen unbesiedelten und besiedelten Scaffolds?
- Kommt es zu Gewebsreaktionen um die Scaffolds?

3. Gefäßversorgung

- Lassen sich Gefäßproliferationen im Scaffold nachweisen?
- Kommt es zu einer zentralen Nekrose?

4. Knochenwachstum und Heilungsprozess

- Wie lässt sich der Wachstumsprozess des Knochens mit unseren in vivo Untersuchungstechniken nachvollziehen?
- Fallen sich wiederholende Wachstumsmuster auf?
- Kann man Kalzifizierungen, bzw. reife Knochenmatrix und Zellen im Scaffold nachweisen?
- Geht Wachstum vom Peri- und/oder Endost aus?
- Lassen sich verschiedene Arten von Knochen differenzieren?

Es ist mit den bisherigen Methoden nicht möglich, den Prozess der Knochenheilung und des Knochenwachstums in vivo hochauflösend und dreidimensional im zeitlichen Verlauf darzustellen. Zur Zeit angewandte Methoden haben entweder den Nachteil, nur eine ungenügende Darstellung zu ermöglichen (Projektionsradiologie, herkömmliche Computertomographen und Magnetresonanztomographen), oder mit einem Überleben des Versuchstieres nicht vereinbar zu sein (Histologie, μ -CT). Die Histologie hat den weiteren Nachteil, dass eine dreidimensionale Rekonstruktion praktisch kaum möglich ist.

Mit der neuen Technologie der flat-panel-volumetric-Computer-Tomography soll eine hochauflösende, dreidimensionale in vivo Darstellung von Knochen möglich sein [60]. Außerdem wurde gezeigt, dass in Maus und Ratte detaillierte Bilder von Gefäßen möglich sind [30, 47]. In dieser Arbeit soll auch geklärt werden, ob das fpvCT eine Alternative zur Evaluation von Versuchen in vivo zum scaffoldbasierten Tissue engineering von Knochen ist und welche der oben genannten Fragen sich mit dieser neuen Methode beantworten lassen.

Zusätzlich wurden zur Verlaufskontrolle bei einer Versuchsgruppe die Projektionsradiographie und post mortem bei jedem Tier ein μ -CT und eine histologische Untersuchung des Osteotomiespaltes und des angrenzenden Knochens durchgeführt.

3

Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Um neu entwickelte Scaffolds in vivo zu testen, ist ein anerkanntes Tiermodell nötig. Dieses muss die Anforderungen der Reproduzierbarkeit und Durchführbarkeit erfüllen und verwertbare Ergebnisse liefern. Das Kaninchenmodell, insbesondere mit der Operationsstelle Femur erfüllte diese Vorraussetzungen in der Vergangenheit bereits [20, 32] und wurde deswegen für dieses Projekt ausgewählt.

Für diese Versuchreihe wurden männliche Nagetiere der Rasse Chinichilla Bastard (Firma Behring) verwendet. In den Vorversuchen zeigte sich, dass die zuerst eingesetzten Kaninchen eine hohe Anzahl von Osteosyntheseversagern aufwies. Wie von Drescher [15] beschrieben, haben Chinchilla Bastarde deutlich belastbareren Knochen. Bei vergleichbarer Anatomie wurde deswegen das Versuchstier gewechselt. Sie waren durchschnittlich 6 Monate alt (zwischen 5 und 7 Monaten) und wogen im Schnitt 4,2 kg (zwischen 3,7 und 4,7 kg). Die Unterbringung erfolgte in Einzelkäfigen

(Größe $1,5\text{m}^2$) und sie wurden ad libitum mit Nahrung und Wasser versorgt. Zur besseren Unterscheidung wurden die Tiere am Ohr mit einer Nummer markiert.

3.2 Implantate

Getestet wurden in diesem Versuch ein aus Poly(laktid-co-glykolid) (PLGA) gemischtes mit Kalziumphosphat beladenes und beschichtetes Kompositgerüst, das durch unterschiedliche Verfahren modifiziert und mit Zellen besiedelt wurde. So entstanden vier unterschiedliche Scaffoldtypen.

3.2.1 Unbesiedelte Scaffolds

Das Grundgerüst der Scaffolds war bei allen vier Typen gleich. Es war ein makroporöses, aus einer Mischung von Poly(laktid-co-glykolid) und Kalziumphosphat bestehendes Gerüst, dessen Geometrie und Porengröße dem Aufbau des menschlichen, trabekulären Knochens nachempfunden ist. Die Scaffolds wurden von der Firma BoneTec Corp. (Toronto, Kanada) bezogen. Das Grundgerüst wurde mit einem dünnen Film aus Kalziumphosphat-Partikeln beschichtet (Coating) und bei der Hälfte der Scaffolds mit porösen Kalziumphosphat-Partikeln beladen (Loading).

Herstellung des Grundgerüsts

Zuckerkristalle (Redpath Sugar, Toronto, Ontario, Canada) mit einem Durchmesser von 0,85 bis 1,18mm wurden in einem versiegelten Kontainer mit befeuchteter Luft im Inkubator bei 37 Grad Celsius für 16 Stunden bebrütet. Danach trockneten sie für 12 Stunden bei Raumtemperatur. Dies führte zum Verschmelzen der Zuckerkristalle zu einem porösen Block. Diese Methode wird „porogen particle fusion method“ genannt [11, 31].

Zur Herstellung der Kalziumphosphatpartikel wurden äquimolare Mengen von Tetrakalziumphosphat und entwässertem Dikalziumphosphat mit destilliertem und deionisierten Wasser gemischt. Die ausfallende Reaktanz wurde durch eigens angefertigte Siebe mit einer Porengröße von 5 bis $45\mu\text{m}$ gefiltert. Der durchschnittliche Durchmesser der Kalziumphosphatpartikel lag bei $27,5\mu\text{m}$ [31].

Poly(DL-laktid-co-glykolid) 75:25 (Birmingham Polymers, Birmingham, AL, USA) wurde nun in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit einer gewichtsbezogenen Konzentration von 10-15% aufgelöst und dann in einem Verhältnis von 2:1 (CaP:PLGA) mit den Kalziumphosphatpartikeln gemischt. Jetzt wurde das klebrige Gemisch über den porösen Zuckerkrystallblock gegossen. Die DMSO-Lösung verteilte sich in dem 10x10x3cm³ großen Block und wurde nach 2-3 Minuten bei -18°C für eine Stunde tiefgekühlt. Nachdem die PLGA-CaP-Lösung im Tiefkühlschrank ausgefallen war, wurden die Zuckerkrystalle aus dem Block herausgelöst. Dies geschah bei 20°C Raumtemperatur in destilliertem und deionisierten Wasser. Der Block wurde für drei Tage im Wasser gelagert und das Wasser 4 mal täglich gewechselt [31]. Es entstand ein 10x10x1,5cm³ großer Scaffold-Block, aus dem mit einer speziellen Säge [45] die Scaffolds herausgesägt wurden.

Coating

Zusätzlich zum Kalziumphosphat im Grundgerüst wurde das Scaffold mit nanoporösen Kalziumphosphatpartikeln beschichtet, „coating“ genannt. Dies erfolgte nach der „biomimetic method“, die durch Weglassen des ersten Schrittes, der „nucleation“ modifiziert wurde. Die PLGA/CaP Scaffolds wurden in 70%igem Ethanol angefeuchtet und mit deionisiertem Wasser gespült. Danach wurden die Grundgerüste für zwei Tage bei 37°C, in hochkonzentriertem (1,5x) simulated body fluid (SBF: Na⁺ 142.0mM, K⁺ 5.0 mM, Mg²⁺ 1.5mM, Ca²⁺ 2.5mM, Cl⁻ 147.8mM, HCO³⁻ 4.2mM, HPO₄²⁻ 1.0mM, SO₄²⁻ 0.5mM) gelagert.

Loading

Um mikroporöse Kalziumphosphat-Partikel in das mit Kalziumphosphat beladene (coated, s.o.) PLGA/CaP-Gerüst einzubinden (=loading), wurde eine abgewandelte Filtrationsmethode benutzt. Hierfür wurde eine Suspension aus porösen Kalziumphosphatpartikeln in 1,5fachem SBF durch das Scaffold gefiltert. Das Verhältnis zwischen den porösen Partikeln und dem Scaffold war 60:1 (gewichtsbezogen). Nach der Filtration wurden die Scaffolds in 1,5fachem SBF für 24h gereift um die porösen Kalziumphosphat-Körnchen mit dem Scaffold zu verbinden. Danach wurden die Scaffolds mit destilliertem Wasser gewaschen bis das Waschwasser klar war

und in einem Exsikkator getrocknet.

Sterilisation

Vor weiterer Verwendung wurden die Scaffolds in Äthylenoxid sterilisiert. Der Vorgang dauerte 2 Stunden bei 94% CO₂, 6% C₂H₄O, 1,7bar und 46°C. Die anschließende Desorptionszeit betrug 14 Stunden. Danach wurden die Trägergerüste unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert. Die Porosität lag im Durchschnitt bei 90% und die Poren waren interkonnektiert verbunden. Die Scaffolds hatten eine Länge von 12mm und einen Durchmesser von 10mm. Die Gewebekompatibilität und die Toxizität wurden vorher in dem EU-Projekt getestet (EU-Projekt G5RD-CT-200-00282 „Tissue Reactor“).

3.2.2 Besiedelte Scaffolds

Ein Teil der Scaffolds wurde mit allogenen Stammzellen besiedelt, gewonnen aus dem Beckenkamm eines Kaninchens, dem kein Scaffold eingesetzt wurde.

Stammzellgewinnung

Das betroffene Tier erhielt eine Prämedikation in Form von Atropin intramuskulär. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten wurde die Narkose mit intramuskulärer Gabe von Ketamin und Rompun eingeleitet. Nach erfolgter Narkose wurde der Beckenkamm palpiert und der Bereich um die Punktionsstelle enthaart. Unter sterilen Bedingungen wurden mit einer 18G Spinal-Nadel der dorsale Beckenkamm punktiert und 3,0ml isotone Natrium-Chlorid Lösung injiziert. Dann wurden 2-6ml Knochenmark aspiriert.

Aufbereitung und Kultur der Stammzellen

Zur Isolierung der Stammzellen aus dem aspirierten Knochenmark, wurde die Histopaque/Ficoll (1:2, Volumenrelation, Dichte 1077g/l) Dichtegradienten-Methode durchgeführt. Die Vorläuferzellen wurden zweimal in phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und danach in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei 95% Luftfeuchtigkeit, 5,0 ± 0,5% CO₂ und 37,0 ± 0,5°C in ZKT-1 Medium (Bio-

chrom) kultiviert. Dem ZKT-1 Medium wurden 10%ige Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10%iges FCS (Invitrogen), 0,2mM L-Ascorbat, 10mM β -Glycerophosphat und 10^{-8} M Dexamethason (Sigma) zugegeben. Kurz vor Erreichen der Zellkonfluenz wurden sie auf die Trägergerüste ausgesät.

Besiedelung der Scaffolds im Bioreaktor

Die kultivierten Zellen wurden in der GBF Braunschweig nach der von Barthold entwickelten Methode auf den Osteoscaf Trägergerüsten ausgesät (10^7 Zellen pro cm^3) [2] und im dort entwickelten Bioreaktorsystem mit kontinuierlicher Perfusion kultiviert [3, 18, 19, 40]. Im Bioreaktorsystem betrug die Temperatur konstant 37°C , der Sauerstoffpartialdruck 20%, die Durchflussrate 0,2ml/min und die Rotationsgeschwindigkeit des Mediumrührers 120 Umdrehungen pro Minute. Nach Kultivierung der Zellen auf den Scaffolds wurden diese per Express - im Kulturmedium in speziellen gekühlten Behältern gelagert - nach Marburg transportiert und noch am selben Tag eingesetzt.

3.3 Einsetzen der Scaffolds

Nach einer Eingewöhnungszeit in der neuen Stallumgebung von einer Woche wurde die Operation zum Einsetzen der Scaffolds durchgeführt. Der Operationsbereich war direkt an die Stallungen der Tiere angegliedert, so dass den Kaninchen lange und belastende Transportwege vor der Operation erspart werden konnten. Alle Osteotomien wurden am linken Femur durchgeführt.

3.3.1 Osteosynthesematerial

Für die Osteosynthese wurde das aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie stammende Universal-Unterkiefer-Implantatsystem der Firma Stryker Leibinger benutzt. Dabei handelt es sich um eine Mandibulaplatte mit Verblockungsschrauben und dem dazugehörigen Werkzeug (siehe Abbildung und Tabelle 3.1, Seite 19).

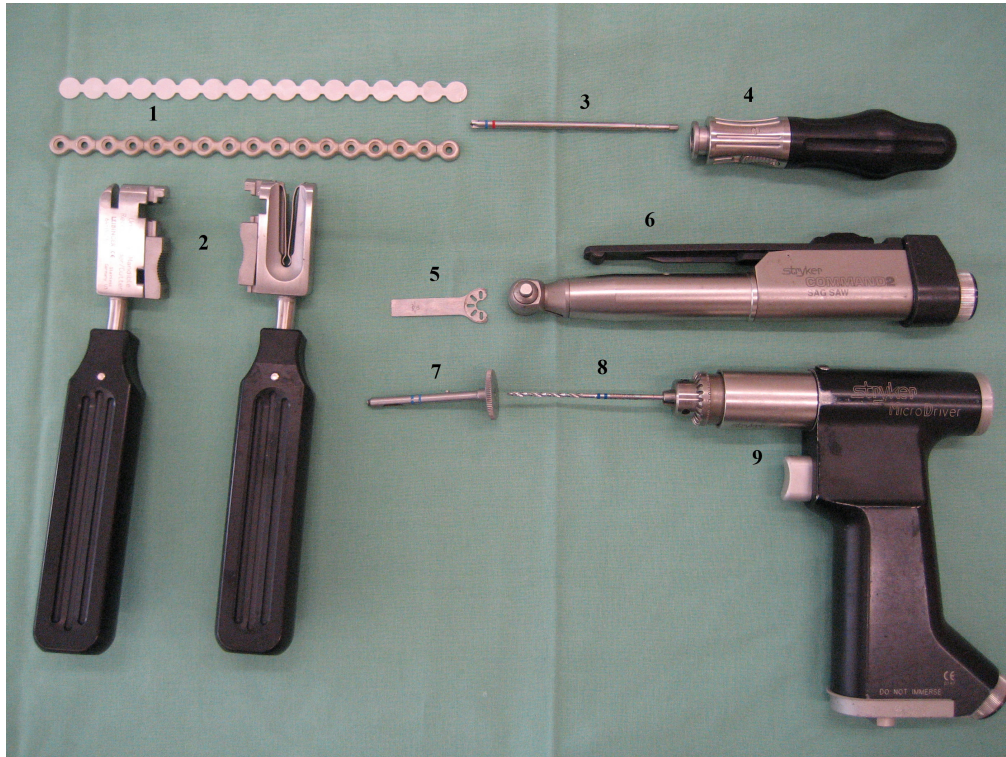


Abbildung 3.1: Osteosynthesystem der Firma Stryker, siehe Tabelle 3.1

Nr. im Bild	Artikel Nr.	Bezeichnung
1	55-28917	Mandibularkonstruktionsplatte mit Schablone
2	64-00230(1)	Schränkeisen links und rechts
3	62-20130	Schraubendreherklinge für 2,0/2,3/2,7mm Schrauben
4	62-20295	Arretierbarer Handgriff
5	2296003115	Sägeblatt schmal (10 mm), lang
6	2296-234	Command2 Sag Saw
7	62-00238	Bohrbuchse zentrisch
8	60-19435	Bohrer 1,9 x 115
9	2296-88	Microdriver
nn	52-27510	Verblockungsschrauben, Cross-Pin, 10mm
nn	52-27512	Verblockungsschrauben, Cross-Pin, 12mm
nn	52-27514	Verblockungsschrauben, Cross-Pin, 14mm
nn	52-27516	Verblockungsschrauben, Cross-Pin, 16mm

Tabelle 3.1: Stryker Leibinger Spezialbesteck, siehe Abbildung 3.1

3.3.2 Operation

Vorbereitung und Anästhesie

Zuerst wurde das Kaninchen aus dem Käfig genommen und gewogen, Gewicht und Erkennungsnummer wurden auf dem OP-Protokoll vermerkt. Danach erhielt das Tier die Prämedikation in Form von Atropin (s. Tabelle 3.2) intramuskulär. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten wurde die Narkose mit intramuskulärer Gabe von Ketamin und Rompun eingeleitet. Intraoperativ wurde bei Bedarf mit Narcoren intravenös und Ketamin i.m. nachdosiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die intramuskulären Injektionen nicht in das zu operierende Bein erfolgten.

Medikament	Wirkstoff	Konzentration	Dosierung
Atropin oder	Atropinsulfat	0,5mg/ml	0,2mg/kg
Robinul	Glycopyrroniumbromid	0,2mg/ml	0,2mg/kg
Rompun	Xylazinhydrochlorid	20mg/ml	1-3mg/kg
Ketamin	Ketaminhydrochlorid	100mg/ml	10-20mg/kg
Narcoren	Pentobarbital-Natrium	160mg/ml	b. B. 3,2mg

Tabelle 3.2: Narkosemedikamente

Bis zum Wirkungseintritt der Narkose wurde das Kaninchen dann in einen ruhigen, warmen und dunklen Raum gesetzt. Nach Eintritt der Narkose wurden Operationsgebiet und Umgebung enthaart und dem Kaninchen der intravenöse Zugang (Vasofix Braunüle 20G, B.Braun, Melsungen, Deutschland) über die Ohrvene gelegt. Zum Schutz der Augen des Tieres wurde eine Salbe aufgetragen. Danach wurde das Tier in den Operationssaal gebracht.

Operationstechnik

Das Kaninchen wurde in Rechtsseitenlage auf dem Operationstisch gelagert, so dass linker Femur und der Katheter in der Ohrvene gut zugänglich waren. Dann wurde das Operationsgebiet großzügig mit Povidon-Jod (10%) desinfiziert, mit OP-Tüchern abgedeckt und ein weiteres Mal desinfiziert. Alle Operationsmaterialien und -bestecke inklusive der Platten und Schrauben wurden vor jedem Eingriff gereinigt und sterilisiert.

Der Zugang zum linken Femur erfolgte von lateral; zuerst wurden Trochanter major und Epicondylus lateralis palpatorisch aufgesucht und dazwischen der fünf bis sechs Zentimeter lange Hautschnitt gesetzt. Nach scharfer Eröffnung der Muskelfaszie wurde stumpf entlang der natürlichen Muskelanatomie bis zum Femurknochen präpariert. Blutungen wurden elektrokoagulatorisch gestillt. Am Femur wurden Fasziensansätze mit dem Rasparatorium abgesetzt und der Knochen mit Hohmannhaken dargestellt (s. Abbildung 3.2).

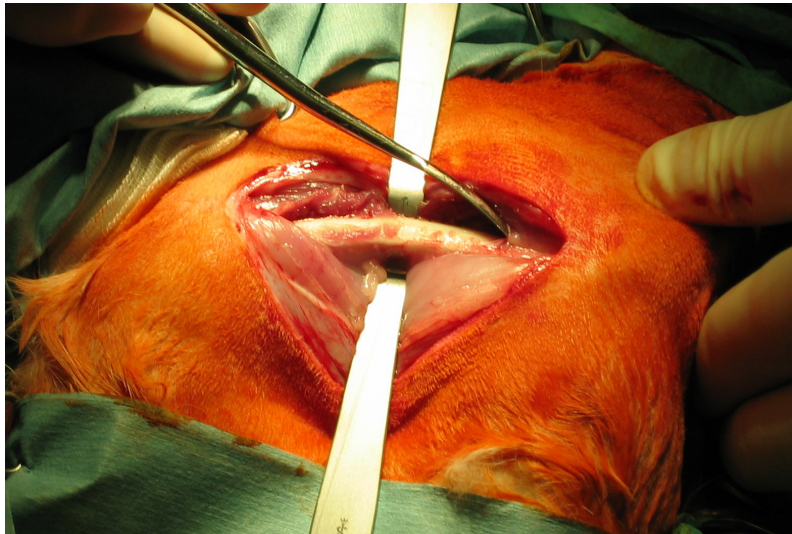


Abbildung 3.2: Freigelegter Femur von kranial

Vom Operationsablauf her erwies es sich als wesentlich günstiger, zuerst die Platte am Femur anzubringen und dann die Osteotomie vorzunehmen. Die ideale Lage für die Platte ist an der antero-lateralen Femurseite zwischen Trochanter major und Epicondylus lateralis mit einer Länge von sieben Schraubenlöchern. So wurde die Schablone für die Platte an den intakten Knochen angepasst. Dann wurde die Unterkieferrekonstruktionsplatte der Firma Stryker anhand der Schablone passend geformt und mittels einer Zange provisorisch am Femur befestigt (s. Abbildung 3.3, Seite 22).

Als nächster Schritt wurden die Löcher gebohrt und die Platte am Knochen als winkelstabiles System mit den Verblockungsschrauben angeschraubt. Dafür wurde der Bohrer der Firma Stryker mit einer 1,9mm Bohrspitze und dazugehöriger Bohrbuchse verwendet. Jeweils sechs 2,7mm starke Verblockungsschrauben mit selbstschneidendem Gewinde befestigten die Platte am Knochen. Die Länge der Schrauben wurde für jedes Loch ausgemessen und lag zwischen 10 und 16 Millimetern. Das mittlere Schraubenloch der Rekonstruktionsplatte wurde freigelassen, da

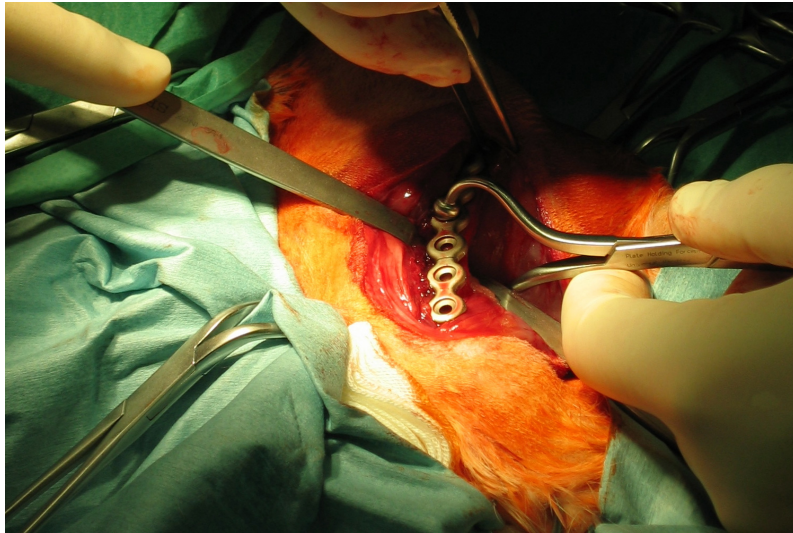


Abbildung 3.3: Angepasste Platte

hier der zentrale Defekt in der Diaphyse des Femurs entstehen sollte (s. Abbildung 3.4).

Durch die stabile Fixierung des Femurknochens war das Sägen des Osteotomiespaltes problemlos möglich. Die Breite des Spaltes wurde der Länge des Scaffolds (12mm) entsprechend ausgewählt, so dass das Implantat ohne Befestigung im Osteotomiespalt verblieb. Durch wiederholtes Kühlen mit Wasser wurde während des Sägens ein Überhitzen des Knochens verhindert.

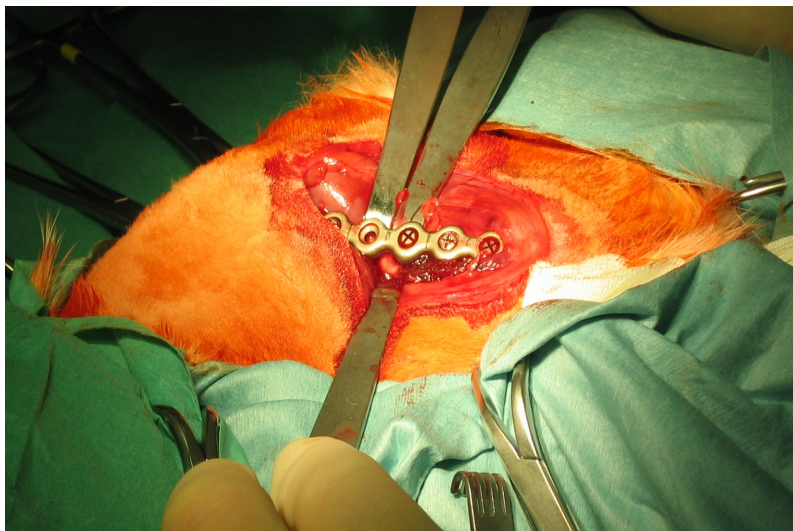


Abbildung 3.4: Distaler Teil der angebrachten Titanplatte, deutlich sichtbar ist das freie Schraubenloch (hier viertes von rechts)

Bevor das Scaffold eingesetzt werden konnte, wurde die Osteotomie mehrmals mit NaCl gespült und das Periost 1cm um den Osteotomiespalt zurück- bzw. ab-

geschoben.

Bei den Kaninchen der Kontrollgruppe (sogenannte Leerdefekte) wurde kein Scaffold in den Spalt gesetzt. Die Operation wurde jedoch davon abgesehen genauso durchgeführt wie bei den Versuchstieren mit Scaffold. Nach dem Einlegen des Implantates wurde die Wunde durch Faszien-, Subkutan- und Hautnaht wieder verschlossen.

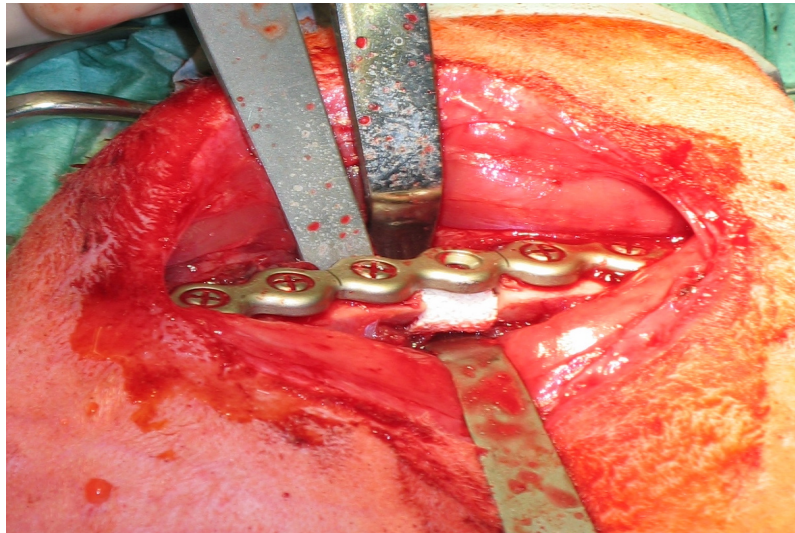


Abbildung 3.5: Implantat im Osteotomiespalt

Postoperative Nachsorge

Direkt nach der Operation wurde den Kaninchen Carprofen (Rimadyl, Pfizer, Karlsruhe) 4mg/kg subkutan gespritzt. Dies wurde drei Tage lang zweimal täglich fortgeführt. Des weiteren wurden der Gesundheitszustand und die Wunde jedes Kaninchens täglich kontrolliert.

3.4 Radiologische Kontrollen

Zur Kontrolle des Operationserfolgs wurde wenige Tage bis maximal eine Woche nach der Operation eine erste radiologische Untersuchung durchgeführt. Diese bestand bei der Versuchsgruppe mit unbesiedelten Scaffolds in Aufnahmen von zwei Ebenen des linken Oberschenkels, in der Gruppe mit allogen besiedelten Scaffolds wurde mit Volumen-CT (s.u.) gearbeitet. Radiologische Kontrollen wurden dann in regelmäßigen Abständen wiederholt um zum einen den Behandlungserfolg zu doku-

mentieren und zum anderen das Abbruchkriterium für den Versuch zu kontrollieren, den knöchernen Schluss des Defekts bei einem Kaninchen mit Leerdefekt.

3.4.1 Nativröntgen

Die erste Röntgenuntersuchung fand im Schnitt 3,6 Tage (1-5 Tage) nach Operation statt. In den ersten vier Wochen bis zur Tötung der Tiere des ersten Versuchszeitraums fand eine radiologische Kontrolle im Abstand von zwei Wochen, danach monatlich statt. Alle Knochen wurden postmortal erneut geröntgt.



Abbildung 3.6: Aufnahme einen Monat nach Operation

Die Untersuchung wurde immer in der Abteilung für Strahlendiagnostik im Uniklinikum Marburg von einem Facharzt für Radiologie durchgeführt. Die Kaninchen wurden in geeigneten Transportboxen in den Vorraum des Durchleuchtungsbereiches gebracht. Es fand keine Narkose statt, da die Prozedur für die Tiere nicht schmerzhaft war. Nach einer klinischen Untersuchung des linken Beines wurden sie in Bauchlage auf den Untersuchungstisch gelegt. Ein Mitarbeiter des Operationsteams fixierte das Kaninchen durch Druck auf den Körper, während ein anderer das linke Bein in Extension und Außenrotation brachte. So konnte der Radiologe unter Durchleuchtung eine möglichst ideale Aufnahme des operierten Femurs anfertigen. Alle Mitarbeiter im Kontrollbereich trugen Bleischürzen und Bleihandschuhe.

3.4.2 Volumen-Computertomographie (fpvCT)

Die computertomographischen Kontrollen wurden in der Abteilung für Neuroradiologie des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit einem neuartigem CT der Firma GE Global Research, Niskayuna, New York, durchgeführt. Dieser flat panel volumetric Computed Tomograph (Kurz: fpvCT, Volumen-CT) arbeitet mit zwei flat panel Röntgensensoren mit einer Auflösung von jeweils 1024x1024 Pixeln. Die maximale Z-Achse beträgt 21cm pro Scan. Dieser Computertomograph ist besonders gut für die dreidimensionale Knochendarstellung bei Kleintieren in vivo geeignet. Eine genauere Beschreibung des Volumen-Computertomographen ist in der Literatur erfolgt [30, 47, 60].

Unsere Aufnahmen wurden mit 120 kV und 40 mA durchgeführt. Die Rotationszeit eines Steps betrug 8 Sekunden bei einer Länge auf der Z-Achse von 42mm. Aufgenommen wurden zwei Steps, so dass eine Z-Achse von 84mm resultierte. Es wurde jeweils ein Durchgang mit und einer ohne Kontrastmittel durchgeführt. Es wurden 10ml Kontrastmittel (Imeron 300, Altana, Konstanz) 50 Sekunden vor dem Scan gespritzt. Bei einer durchschnittlichen Bilderzahl von 420 ergab sich in der Rekonstruktion die Voxelgröße von $0,2\text{mm}^3$ und ein field of view von $102 \times 102 \times 84\text{mm}^3$. Die Rekonstruktion wurde mit einem Linux basierten Netzwerk aus 7 Dual Core 2,2GHz Prozessor PCs und einem cone beam gefilterten Rückprojektionsalgorithmus ausgeführt. Die Rekonstruktionszeit betrug ungefähr 13 Minuten. Die Darstellung der Bilder erfolgte auf einer Advantage Workstation, Version 4.1 der Firma GE Medical Systems, basierend auf einem Linux-PC mit Dual Core 2,2GHz Prozessor und 4GB RAM. Die Auswertung erfolgte in der Maximum Intensity Projection (MIP) und Volume Rendering Darstellung, betrachtet wurden sowohl die dreidimensionale Rekonstruktion, als auch die sagittale, axiale und coronare Schnittebenen.

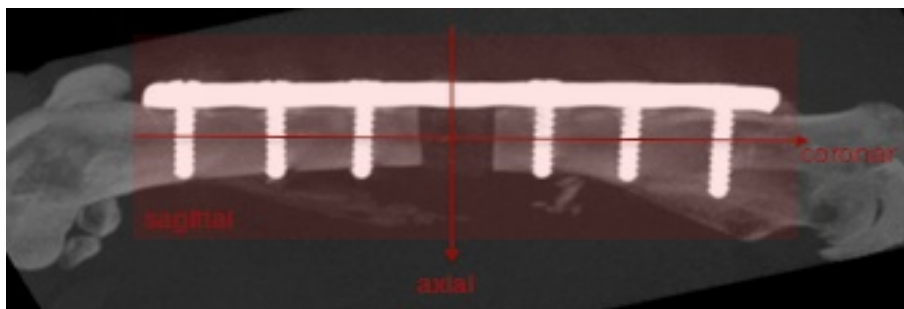


Abbildung 3.7: In dieser Arbeit benutzte Terminologie der Schnittebenen

3.5 Ende der Versuchszeiträume

Es gab zwei Versuchszeiträume: Vier und 26 Wochen. Wenn jedoch vor Ende der 6 Monate der knöcherne Schluss des Osteotomiespaltes bei einem Leerdefekt festgestellt wurde, führte dies automatisch zum Abbruch des Versuchs. Am Ende eines Versuchszeitraums wurden die Kaninchen euthanasiert, der linke Femur entnommen und dieser in Formalin konserviert.

3.5.1 Euthanasie

Die Vorbereitungen zur Euthanasie der Kaninchen verliefen genau so wie zur Operation: Zuerst wurden die Kaninchen mit Atropin (s. Tabelle 3.2, Seite 21) prämediziert und dann die Narkose durch intramuskuläre Gabe von Ketamin und Rompun eingeleitet. Allerdings wurden hier immer die Maximaldosen verabreicht. Nach Eintritt der Narkose wurde der intravenöse Zugang (Vasofix Braunüle 20G, B.Braun, Melsungen, Deutschland) gelegt.

Da es für die histologischen Auswertungen des Heilungsprozesses essentiell war, dass der Knochen möglichst frein von Blut- bzw. Erythrozyten war, mussten die Tiere perfundiert werden. So wurde bei den in tiefer Narkose liegenden Kaninchen die Bauchdecke eröffnet und bis zur Vena cava inferior präpariert. In diese wurde in Richtung des Herzens ein großlumiger Zugang gelegt und NaCl angeschlossen. Ungefähr ein Zentimeter distal des Zugangs wurde dann die Vene mit einem Skalpell punktiert und das austretende Blut aufgesaugt. Es wurde mit NaCl perfundiert bis die Leber eine sandartige Farbe hatte.

Dann wurde das Abdomen wieder verschlossen, das linke Femur inklusive Bindegewebe entnommen sofort in 10-prozentige Formalinlösung gelegt und dort bis zur weiteren Untersuchung belassen. Die Formalinlösung wurde mindestens zehn Tage täglich gewechselt und auf dem Agitator bewegt.

3.6 Herstellung der histologischen Präparate

Bei Zähnen und Knochen, aber auch bei metallischen und keramischen Implantaten hat die Härte dieser Materialien früher eine wesentliche Erschwernis der histolo-

gischen Untersuchung bedeutet. Man konnte entweder Schliffpräparate von uneingebetteten Hartgeweben untersuchen, musste dabei aber auf zelluläre Details und den Erhalt der Weichgewebe verzichten oder der Knochen musste zuerst einer Demineralisation unterzogen werden bevor er in routinehistologischen Verfahren z. B. mit Paraffin eingebettet werden konnte. Mit dem Entkalken gehen aber wertvolle Informationen über den Zustand der Knochenmatrix verloren.

Durch die Einführung von geeigneten Kunstharzen konnte für die optimale Erhaltung von Hart- und Weichgeweben und Zellen gesorgt und zugleich die Schneidfähigkeit der Proben mit Hartmikrotomen oder Trenn-Dünnschliffverfahren erzielt werden. Diese Techniken wurden aus der Mineralogie und Metallurgie übernommen und so können mit ihnen auch metallische und keramische Implantate zusammen mit dem Knochen in situ untersucht werden. Erstmals wurde 1949 von Puckett Methacrylat eingesetzt, dass aber zu hart und brüchig war und deshalb nur mit Sägemikrotomen bis zu einer minimalen Dicke von $25\mu\text{m}$ geschnitten werden konnten.

Durch Kombination von Polymethylmethacrylat (PMMA) und Weichmachern wie Polyäthylenglykol 1500 [6], Dibutylphthalat [71] und/oder Plastoid N [7] entstand das bis heute weitverbreitete Einbettungsmedium für unentkalkte Knochenschnitte. Hier kann das Sägemikrotom durch ein Mikrotom mit Hartstahlmesser ersetzt werden und es sind Dicken bis zu $10\mu\text{m}$ möglich.

Das hier verwandte Technovit 9100 Neu der Firma Kulzer ist eine Weiterentwicklung des von Donat propagierten Technovit 7200 [14]. Es besitzt ein erweitertes Spektrum in der Lichtmikroskopie und soll auch mit dem Mikrotom zu schneiden sein.

3.6.1 Schneiden, Entwässerung und Entfettung

Es wurden der proximale und distale Teil des Femurs entfernt, so dass nur noch der diaphysäre Teil um den Osteotomiespalt übrig blieb. Danach wurden die Präparate 12 Stunden lang gewässert um das Formalin auszuspülen. Jetzt konnten die Proben in einer aufsteigenden Alkoholverdünnungsreihe entwässert werden (s. Tabelle 3.3, Seite 28).

Zur Entfettung der Knochenstücke wurden diese für 48 Stunden in Xylol und dann für weitere 48 Stunden in eine Xylol/Technovit-Mischung zur Vorbereitung auf

1.	Alkohol 70%	24 Stunden
2.	Alkohol 80%	24 Stunden
3.	Alkohol 90%	24 Stunden
4.	Alkohol 100%	24 Stunden
5.	Alkohol 100%	24 Stunden
6.	Xylol	24 Stunden
7.	Xylol	24 Stunden
8.	Xylol/Technovit®1:1	24 Stunden
9.	Xylol/Technovit®1:1	24 Stunden

Tabelle 3.3: Schritte zur Entwässerung und Entfettung

die Einbettung eingelegt. Da eine sorgfältige Entwässerung und Entfettung von ausschlaggebender Bedeutung für eine gute Durchtränkung und Polymerisation sind [64], wurden alle Medien regelmäßig gewechselt und unter Agitation auf dem Schüttler verwendet.

3.6.2 Einbettung

Nach Abschluss der Fixation und Verdünnungsreihe erfolgte die Einbettung der Knochenproben in Technovit 9100 Neu (Kulzer). Dafür musste zuerst die Basislösung von Technovit 9100 entstabilisiert werden. Es wurden 50g Aluminiumoxid in eine Chromatographiesäule gefüllt. Dann wurde die Technovit 9100 Basis hinzugegeben. So konnte die Säule 3-4 Liter Basislösung entstabilisieren. Die entstabilisierte Lösung wurde dann direkt weiterverarbeitet und bei 4°C aufbewahrt oder bei -15 bis -20°C im Tiefkühlschrank gelagert. Aus ihr wurden in Kombination mit den anderen vier Komponenten alle Gebrauchslösungen hergestellt (s. Tabelle 3.4, Seite 29).

Zur weiteren Vorbereitung der Einbettung durchliefen die Knochen noch für jeweils zweimal 24 Stunden das Präinfiltrations- und das Infiltrationsmedium. Dabei wurden sie bei 4°C gelagert. Zur Einbettung wurde die Polymerisationslösung aus den Stammlösungen A und B hergestellt. Hierzu wurden 9 Teile Stammlösung A zu einem Teil der Stammlösung B gegeben und mit einem Rührer gemischt bis das Gemisch schlierenfrei war. Dann wurde die Polymerisationslösung über die Knochenproben in verschließbare Plastikgefäße gegossen. Um Luftblasen aus dem Gemisch zu entfernen wurden die Proben für 10 Minuten im Exsikator einem leichten Va-

Materialnummer	1	2	3	4	5
Bezeichnung	<i>Basislösung</i>	<i>PMMA-Pulver</i>	<i>Härter 1</i>	<i>Härter 2</i>	<i>Regler</i>
<i>Präinfiltration</i>	200ml		1g		
<i>Infiltration</i>	ad 250ml	20g	1g/2g*		
<i>Stammlösung A</i>	ad 500ml	3g/4g*			
<i>Stammlösung B</i>	ad 50ml			4ml	2ml

* Bei Verwendung von stabilisierter Basislösung

Tabelle 3.4: Herstellung der Gebrauchslösungen aus den Technovit 9100 Neu

kuum ausgesetzt. Danach wurden die Gefäße mit einer Polyäthylenfolie (Fa. Kobe, Marburg) und dem passenden Deckel luftdicht verschlossen und zum Polymerisieren bei -20°C mehrere Tage bis zum Aushärten gelagert.

3.7 μ -CT

Um die diaphysären Femurknochen mikroradiologisch untersuchen zu können, musste zuerst das verbleibende Osteosynthesematerial entfernt werden. So wurden Platte und Schraubenreste mit einem Diamantrotationssystem (Fa. Exakt, Norderstedt) abgetrennt. Die maximale Größe der Knochenprobe durfte eine Kantenlänge von 2cm nicht überschreiten und so wurden die eingebetteten Knochen dem entsprechend zurechtgeschnitten, jedoch ohne dass der Osteotomiespalt beschädigt wurde.

Für die Aufnahmen wurde das μ -CT Skyskan1072 (Fa. Skyskan, Aartselar, Belgien) benutzt. Die Röntgenröhre arbeitete mit einer Spannung von 100kV und einer Stromstärke von 0,1mA, die Fokusgröße betrug 8 μ m. Die Detektorengöße war 1024x1024 (12bit CCD-Detektor), die Pixelgröße bei maximaler Vergrößerung betrug 2 μ m. Zur Rekonstruktion wurde ein Cone-Beam-Algorithmus benutzt. Zur genaueren Beschreibung der Technologie des μ -CTs siehe Engelke et. al. [17].

3.8 Herstellung der histologischen Präparate

Dank der Entwicklung von geeigneten Einbettungskunststoffen ist es mittlerweile möglich, histologische Präparate aus unentkalkten Knochen herzustellen. Aus

dem eingebetteten Knochen können entweder mit dem Mikrotom Schnitte oder mit der Trenn-Dünnschliff-Technologie Schliffe hergestellt werden. Das hier angewandte Trenn-Dünnschliffverfahren hat bei vergleichbarer Zellerhaltung gegenüber dem Schneiden mit dem Mikrotom den Vorteil der besseren Strukturerhaltung. So bleibt bei unentkalkten Hartgeweben der für die Beurteilung sehr wichtige Mineralgehalt erhalten [64].

Die von Donath [14] etablierte Methode der Herstellung von Dünnschliffen aus Hartmaterialien wurde für die Herstellung der histologischen Schnitte übernommen. Statt des Einbettkunststoffes Technovit 7200 wurde aber das neuere Technovit 9100 Neu (s.o.) verwendet.

3.8.1 Vorbereitung

Zunächst wurde der Knochenblock in der Frontalebene möglichst planparallel geschliffen. Da dies aber schon durch das Zurechtschneiden für die Mikro-CT meist hinreichend erreicht wurde, wurden die Seiten nur noch im Exakt-Mikroschleifsystem mit 1000er Schleifpapier geglättet. Pro Präparat wurden dann bei einem Objektträger eine Seite angeschliffen und bei einem weiteren die Kanten glattgeschliffen, um später eine bessere Haftung des Kunststoffes bzw. ein Ansaugen an die Vakuumpumpe zu ermöglichen.

3.8.2 Das Trenn-Dünnschliff System

Exakt-Vakuum-Klebevorrichtung zur planparallelen Aufblockung

Die Klebevorrichtung besteht aus zwei parallelen Platten, die auf einer Achse zueinander verschieblich sind. Auf der Unterseite der Deckplatte befindet sich eine Vakuumeinrichtung um dort Objektträger zu befestigen. Auf die Bodenplatte wurde der Kunststoffblock mit der zu untersuchenden Seite nach unten gelegt. Unter der Deckplatte wurde der Objektträger mit der angeschliffenen Seite nach unten angebracht.

Dann wurde der Drei-Komponenten-Kunststoff Technovit 4000 (Kulzer, s. Tabelle 3.5, Seite 31) angemischt. Dieser wurde dann auf die Oberfläche des Kunststoffblocks angebracht und die Deckplatte soweit abgesenkt, dass das Technovit

Materialnummer	1	2	3
Bezeichnung	<i>Sirup 1</i>	<i>Sirup 2</i>	<i>Pulver</i>
<i>Nach Gewicht</i>	2 Teile	1 Teil	2 Teile
<i>Nach Volumen</i>	2 Teile	1 Teil	2 Teile

Tabelle 3.5: Herstellung des Technovit 4000 Kunststoffes

4000 großflächig den Objektträger berührte. Nach einer Aushärtezeit von 8-10 Minuten konnte der Kunststoffblock mit dem parallel zur Blockoberfläche montierten Objektträger entfernt werden. Jetzt konnte die so vorbereitete Probe im Exakt Mikroschleifsystem komplett planparallel geschliffen werden.

Exakt-Präzisions-Klebepresse

Mit dieser Vorrichtung wurde der endgültige Objektträger mittels des lichthärtenden Klebers Technovit 7210 VLC (Kulzer) am Kunststoffblock befestigt. Vorher musste jedoch die Dicke des aufgebockten Blocks mit Objektträger gemessen werden. Dazu wurde eine Mikrometerschraube mit Digitalanzeige (Mitutoyo) verwendet. Nach Kleben und Vermessen des endgültigen Objektträgers konnte so die Klebeschichtdicke ermittelt werden.

Die verwendete Klebepresse funktioniert nach demselben Prinzip wie die oben beschriebene Klebevorrichtung. Da hier aber lichthärtender Kleber verwendet wurde, war die Deckplatte aus Plexiglas und es war eine UV-Lampe im Gerät integriert. Der endgültige Objektträger wurde mit der Vakuumeinrichtung an der Unterseite der Deckplatte befestigt. Der mit Technovit 4000 am ersten Objektträger befestigte Block wurde dünn mit Technovit 7210 VLC bestrichen, auf die bewegliche Bodenplatte der Klebepresse gelegt und an den endgültigen Objektträger gedrückt. Durch die durchsichtige Deckplatte wurde kontrolliert, ob die Klebeschicht blasenfrei war. Mit der einzuklappenden UV-Lampe wurde der Photopolymerisationvorgang gestartet. Dieser war nach 8-10 Minuten abgeschlossen.

Jetzt wurde die Gesamtdicke des Blockes mit den zwei angeklebten Objektträgern gemessen. Dieser Wert minus den zwei zuvor ermittelten (Dicke des Blocks mit erstem Objektträger und Dicke des endgültigen Objektträgers) ergab die Klebeschichtdicke des lichthärtenden Klebers.

Exakt-MCP-Trenn-Schleifsystem

Mit der Diamantsäge des Exakt-MCP-Trenn-Schleifsystems wurde der Trennschnitt hergestellt. Der Block wurde mit dem endgültigen Objektträger an der Vakuumplatte des Systems befestigt und das Sägeblatt an den Objektträger herangeführt, bis ein minimaler Kontakt bestand. Dann wurden Objektträger und Sägeblatt parallel zueinander ausgerichtet und die Sägeschichtdicke auf $200\mu\text{m}$ inklusive der Klebeschichtdicke eingestellt. Bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit und ständiger Kühlung wurde dann der Trennschnitt vom Hauptblock abgetrennt. Danach wurde die Dicke des Trennschnitts gemessen, diese ergab sich aus der Dicke des endgültigen Objektträgers und der Klebeschichtdicke abgezogen von der Gesamtdicke des Präparats.

Herstellung des endgültigen Dünnschliffpräparats

Am Exakt-Mikroschleifsystem wurde dann das Präparat auf die Zieldicke von $80\mu\text{m}$ geschliffen und mit feinkörnigem Papier poliert. Auch hier fand die Befestigung am System über eine Vakuumpumpe statt und die Dicke wurde ständig durch eine Mikrometerschraube kontrolliert.

3.8.3 Färben des Dünnschliffs

Zur Beurteilung des Knocheneinwachsverhaltens und Kontrolle der Ergebnisse des Mikro-CTs wurden die Schliffe Toluidinblau gefärbt. Die Färbelösung wurde nach dem Rezept von Donath [14] angesetzt:

1. Lösung A

- 800ml Aq. dest.
- 8g Na-Tetraborat (Merck)
- 8g Toluidinblau
- 15min mit dem Magnetrührer mischen

2. Lösung B

- 200ml Aq. dest.

- 2g Pyronin G (Waldeck)
 - 15min mit dem Magnetrührer mischen
3. Lösung A und B werden 15min auf dem Magnetrührer vermischt und dann zweimal filtriert

Diese Färbung bietet gute Differenzierungsmöglichkeiten durch metachromatische Farbeffekte. Mineralisierter Knochen stellt sich ungefärbt bis blassblau dar, Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume, Kittlinien und Kollagenfasern sind blau, Mastzellen-granula, Knorpelmatrix und frühe Wundheilungsareale metachromatisch rotviolett gefärbt. Färbevorgang:

1. 10min 30%iges Wasserstoffperoxid
2. Spülen in Aq. dest.
3. 15min Toluidinblau-Färbelösung
4. Spülen unter fließendem Wasser

3.8.4 Histologische Auswertung

Die histologischen Präparate wurden mit einem Leica Mikroskop ausgewertet (Leica DMRX). Dabei wurde die Schnitte unter Aufflicht, Durchlicht und polarisiertem Licht betrachtet.

3.9 Datenauswertung

Um die Möglichkeiten und Reliabilität des Volumen-CTs zur in vivo Beurteilung des Einwachsverhaltens von Knochen beurteilen zu können, wurden als Vergleichsmöglichkeit Histologie und μ -CT als etablierte ex vivo Methoden durchgeführt (s.o.). Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, wurden die drei Untersuchungsmethoden von drei verschiedenen Gruppen ausgewertet. Die histologischen Präparate wurden nach Anfertigung in unserer Arbeitsgruppe in Marburg in Ulm durch die Arbeitsgruppe qualitativ ausgewertet.

Die Daten aus dem μ -CT wurden in Regensburg durch zwei unabhängige Experten beurteilt: Ein Radiologie und ein Unfallchirurg bewerteten die Datensätze qualitativ und quantitativ. Dabei wurde in der quantitativen Auswertung der Mineralisationsgrad in zwei Stufen eingeteilt. Erstens keine oder nur sehr unvollständige Mineralisation und zweitens mehr als 30% des Defektlumens füllende Mineralisation. Diese Auswertung wurde ohne Kenntnis der histologischen Ergebnisse durchgeführt.

Schließlich wurden von unserer Marburger Arbeitsgruppe die Volumen-CT Aufnahmen ausgewertet, ohne Kenntnis der histologischen und der Ergebnisse aus dem μ -CT. Auf Grund der komplexen Fragestellungen wurde in zeitlicher Reihenfolge jedes Volumen-CT eines Tieres betrachtet und mit speziellem Augenmerk auf Osteosynthese, Scaffold, Knochenwachstum, eventuell auftretende Infektion oder zentrale Nekrose beurteilt. Erst nachdem alle Volumen-CTs ausgewertet waren, wurden die Ergebnisse mit denen aus Histologie und μ -CT verglichen.

4

Ergebnisse

4.1 Verlauf des Versuchs

4.1.1 Vorversuche

In den Vorversuchen sollten die Operationen zum Einsetzen des Scaffolds und die Osteosynthese erprobt werden. Während die Operationen problemlos verliefen, kam es zu einer sehr hohen Quote von Osteosyntheseversagen. Bei 10 von 14 (71%) Kaninchen kam es innerhalb der ersten zwei Wochen post-OP zu einem Schraubenausriss. Meist rissen alle drei Schrauben inklusive der Platte komplett aus dem proximalen oder - häufiger - distalen Femurteil aus. Die Schrauben hatten in der Platte zuviel Spielraum und so wurde durch die Bewegung der Schrauben der Schraubenkanal im Knochen stark erweitert und die Osteosynthese verlor ihre Stabilität. Es kam nie zu einem Materialversagen im Sinne von Schrauben- oder Plattenbruch. Um dieser Problematik zu begegnen, wurde die verwendete Osteosynthese auf das oben beschriebene winkelstabile Plattensystem (Stryker, siehe Abschnitt 3.3.1, Seite 19)

umgestellt und die New Zealand White Rabbits durch Chinchilla Bastard Kaninchen ersetzt, die eine für diese Versuche bessere Knochenqualität haben sollten [15] (siehe Abschnitt 3.1, Seite 16).

4.1.2 Versuchsgruppen

Für den gesamten Versuch inklusive aller Versuchsgruppen und -zeiträume wurden insgesamt 33 Tiere operiert. Davon konnten 19 in die Auswertung aufgenommen werden. Bei den 14 ausgefallenen Tieren war der oben beschriebene Schraubenausriss die häufigste Ursache (6 Tiere, bzw. 18% aller operierten Tiere). Weitere Ursachen waren bei einem Tier eine postoperativ aufgetretene Paraplegie, zwei unklare Todesfälle und ein Abknicken der Osteosyntheseplatte. Vier Versuchstiere aus der Versuchsgruppe der mit allogenen Zellen besiedelten Scaffolds starben bei der Kontrastmitteluntersuchung im fpvCT (siehe Abschnitt 4.3.1, Seite 42). Diese konnten zwar nicht in die definierten Versuchszeiträume aufgenommen werden, wurden aber trotzdem mit ausgewertet.

Zuerst wurde die Versuchsreihe mit unbesiedelten Scaffolds gestartet. Die knöcherne Integration sollte mittels nativem Röntgen durchgeführt werden. Hier schien bei einem Leerdefekt nach 20 Wochen ein knöcherner Schluss des Osteotomiespaltes vorzuliegen (siehe Abschnitt 4.2.3, Seite 41 und Abbildung 4.4, Seite 41). Damit war ein Abbruchkriterium des Versuchs erfüllt und dieser wurde nach 20 Wochen beendet. Die Gruppe der mit mesenchymalen allogenen Stammzellen besiedelten Scaffolds wurde dem entsprechend auch nur 20 Wochen beobachtet, jedoch erfolgte die Verlaufskontrolle mit fpvCT. So ergaben sich folgende Versuchsgruppen und -zeiträume (s. Tabelle 4.1, Seite 38).

Bei allen in den Versuch aufgenommen Tieren und außerdem bei den vier im fpvCT gestorbenen Tieren wurden ein μ -CT und eine Histologie durchgeführt. Diese Methoden stellten eine Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen sicher. Des weiteren sollten sie in der Gruppe der mit mesenchymalen, Stammzellen besiedelten Scaffolds zur Evaluation des fpvCTs herangezogen werden.

	Zeitraum(w)	
Versuchsgruppe	4	20
Scaffold unbesiedelt		
coated	n=3	n=3
coated and loaded	n=3	n=3
Scaffold allogene besiedelt		
coated	n=1	n=1
coated and loaded	n=1	n=1
Leerdefekt		
	n=1	n=2

Tabelle 4.1: Versuchsgruppen und -zeiträume, n=Anzahl der Tiere

4.2 Projektionsradiographie

Die radiologischen Kontrollen wurden vor allem zur Klärung von drei Fragen durchgeführt: So sollten die postoperativen Aufnahmen den korrekten Sitz des Scaffolds im Osteotomiespalt klären, die Verlaufsaufnahmen eine Osteosyntheseinsuffizienz aufdecken die Defektüberbrückung bei einem Kaninchen aus der Kontrollgruppe - Osteotomie ohne Einsetzen eines Scaffolds - womit ein Abbruchkriterium des Versuchs erfüllt wäre. Des weiteren sollte der Heilungsprozess dokumentiert werden. Eine korrekte Untersuchung des Femurs in zwei Ebenen und damit die räumliche Einschätzung des Geschehens war trotz des Einsatzes eines C-Bogens nicht möglich, da die Osteosyntheseplatte die Sicht auf die zweite Ebene stark einschränkte und die Ebenen schwer einzustellen waren. Damit war eine Beurteilung der Defektüberbrückung praktisch nicht möglich.

4.2.1 Scaffoldnachweis

In den ersten Aufnahmen eine Woche postoperativ konnte in keinem der Röntgenuntersuchungen ein Scaffold im Osteotomiespalt nachgewiesen werden. Es zeigte sich in machen Fällen im Spalt eine unregelmäßige Verschattung, doch war es nicht möglich diese eindeutig als Scaffold zu identifizieren und deren Begrenzung festzustellen. Also konnte auch nicht der korrekte Sitz der Scaffolds und der Kontakt mit proximalen und distalen Femuranastomosen gezeigt werden. Die Degradation des

Scaffolds konnte ebenfalls nicht dargestellt werden (siehe Abbildung 4.1).

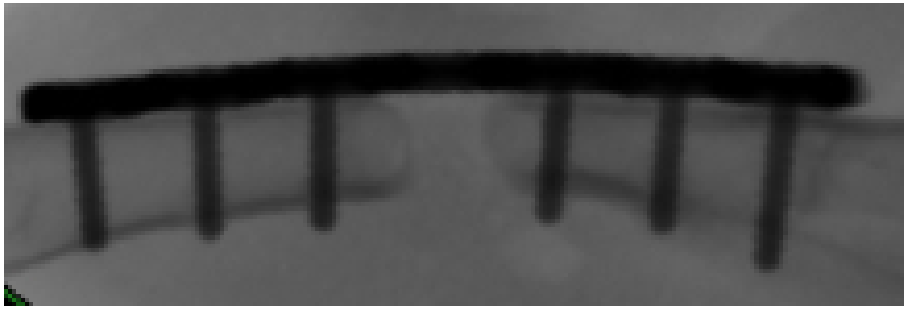


Abbildung 4.1: Projektionsradiographisches Röntgen, unbesiedeltes Implantat eine Woche postoperativ: Es ist kein Scaffold darstellbar, an den Schnittkanten der Anastomosen erkennt man, dass das Femur nicht ideal getroffen ist (rechts proximal)

4.2.2 Osteosyntheseinsuffizienz

Bei vier Tieren kam es zu einer Osteosyntheseinsuffizienz. Hier kam es in drei Fällen zu einem Herausreißen der Schrauben und in einem Fall zu einem Abknicken der Platte direkt über dem Osteotomiespalt. Diese Entwicklungen ließen sich sehr gut zeigen (siehe Abbildung 4.2).

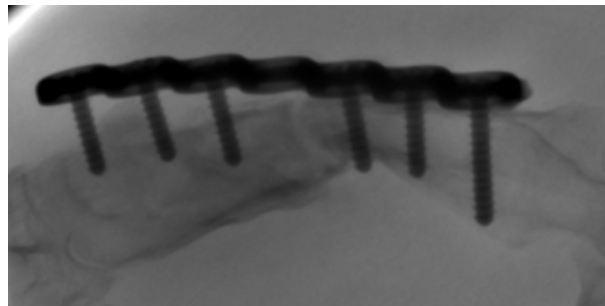


Abbildung 4.2: Projektionsradiographisches Röntgen, unbesiedeltes Implantat, zwei Wochen postoperativ: Die distalen Schrauben sind ausgerissen (rechts proximal)

4.2.3 Wachstum des Knochens

Auf Grund der oben beschriebenen Probleme in der räumlichen Einschätzung der untersuchten Femora war auch das Wachstum des Knochens schwer zu beurteilen. Bei keinem Tier war vier Wochen postoperativ Knochen in den Osteotomiespalt eingewachsen, nach 10 Wochen war Knochenwachstum im Osteotomiespalt bei allen Tieren zu erkennen (siehe Abbildung 4.3, Seite 40).

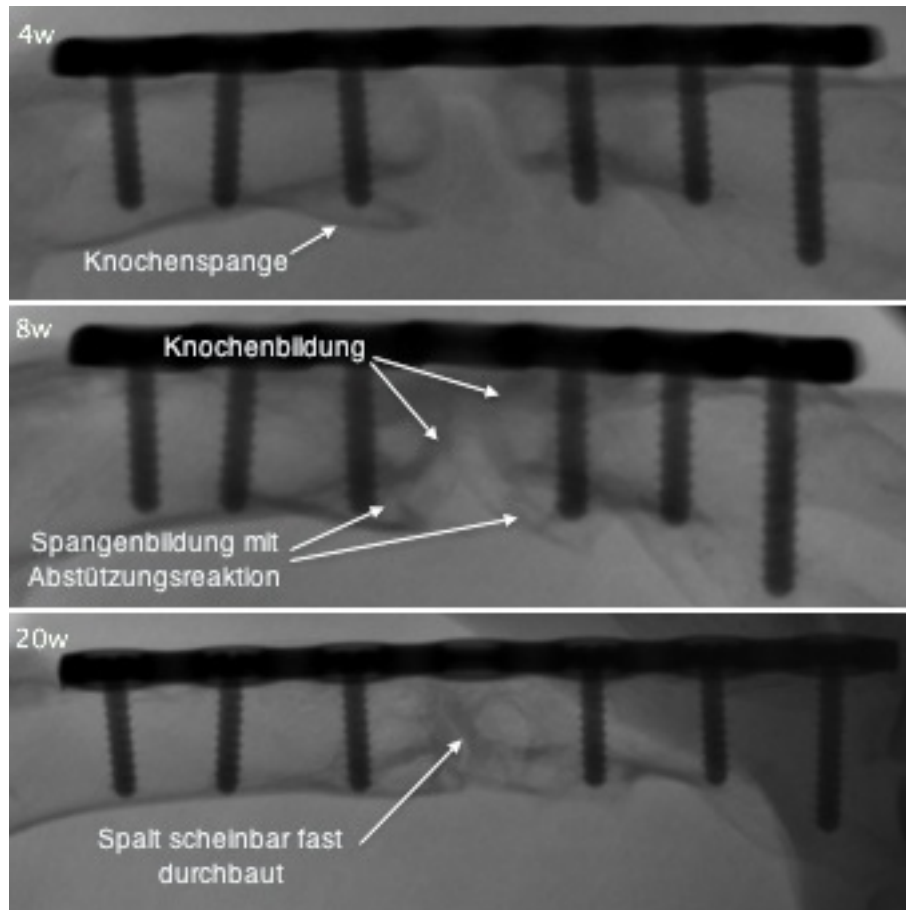


Abbildung 4.3: Projektionsradiographisches Röntgen, unbesiedeltes Implantat, Wachstumsverlauf, rechts proximal: Nach 4 Wochen (oben) ist noch kein Knochen in den Osteotomiespalt eingewachsen, jedoch kann man die Spangenbildung von distal beobachten, 8 Wochen postoperativ (mitte) findet sich Knochen und nach 20 Wochen (unten) scheint es, als wäre der Spalt fast durchbaut (rechts proximal). Hier erkennt man auch die schwierige Einstellung der korrekten Ebene

Bei allen Tieren kam es außerhalb des Osteotomiespalt es zu Knochenwachstum. Es bildeten sich gegenüber der Platte Spangen, die vom distalen Femurteil nach proximal über den Osteotomiespalt wuchsen. Diese erreichten in mehreren Fällen die proximale Femuranastomose. Es konnte nicht gezeigt werden, ob es zu einer knöchernen Verbindung der beiden Teile kam. Auch proximal des Osteotomiespalt bildete sich Knochen, dieser wuchs jedoch nicht über den Osteotomiespalt. Ausgangspunkt der Knochenbildung schienen die Austrittsstellen der Schrauben zu sein, dies ließ sich aber anhand des Bildmaterials nicht mit Sicherheit belegen.

Nach 20 Wochen wurde bei einem Leerdefekt der Schluss des Osteotomiespalt es vermutet, da sich in einer Ebene eine scheinbar durchgängige Kortikalislinie verfolgen

ließ. Deswegen wurde der Versuch zu diesem Zeitpunkt beendet (siehe Abbildung 4.4).

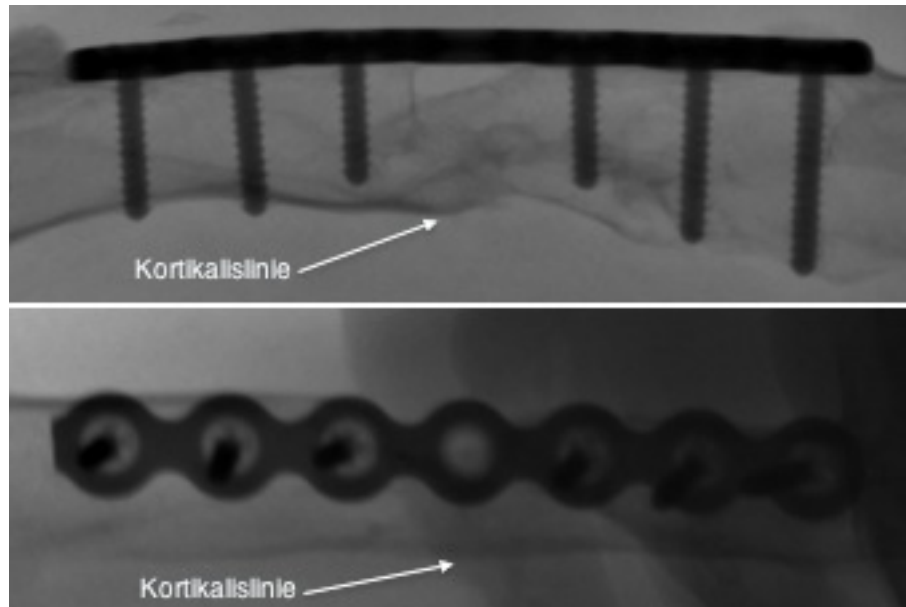


Abbildung 4.4: Projektionsradiographisches Röntgen, Leerdefekt, rechts proximal: Nach 20 Wochen scheint der Osteotomiespalt geschlossen, in der zweiten Ebene (unten) ist eine scheinbar durchgehende Kortikalislinie verfolgbar. Man kann jedoch auch erkennen, dass der Defekt nicht vollständig ausgefüllt ist (oben)

4.2.4 Zusammenfassung

Auf Grund der eingeschränkten Beurteilbarkeit des räumlichen Geschehens und der zu geringen Auflösung konnten zentrale Fragen nicht beantwortet werden. Vor allem war der korrekte Sitz des Scaffolds nicht beurteilbar und die Wachstumsprozesse in und um den Osteotomiespalt nicht im Detail zu erkennen. Deswegen wurden bei der folgenden Versuchsgruppe die Verlaufskontrollen mittels fpvCT durchgeführt.

4.3 fpvCT

Das fpvCT diente zur Verlaufskontrolle in der Gruppe der mit allogenen, mesenchymalen Stammzellen besiedelten Scaffolds und ersetzte damit die projektionsradiographischen Kontrollen. Es sollten mit dieser Methode das Scaffold und dessen korrekter Sitz im Osteotomiespalt nachgewiesen, die Wachstumsprozesse und die Degradation des Scaffolds genauer verfolgt und Gründe für Osteosyntheseveragen ge-

gefunden werden. Des weiteren wurde versucht, mittels Kontrastmittelapplikation die Gefäßversorgung des Femurknochens und eventuell in den Osteotomiespalt einwachsende Gefäße darzustellen. Die Auswertung der fpvCT-Bilder wurde ohne Kenntnis der Ergebnisse aus Histologie und μ -CT vorgenommen. Alle anatomischen Angaben der Ebene und des Raumes beziehen sich auf den Knochen in situ, wenn es nicht anders beschrieben wurde. Die Schrauben sind von proximal nach distal von 1-6 durchnummeriert und werden dementsprechend im Text benannt (siehe Abbildung 4.5).

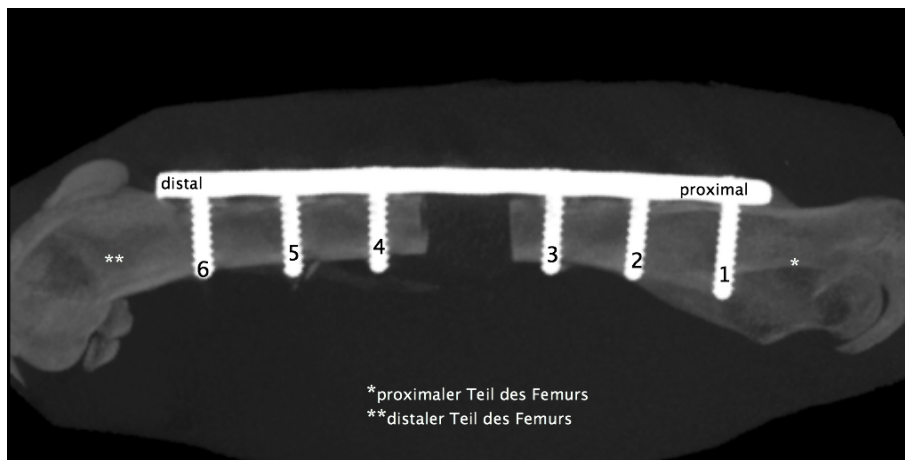


Abbildung 4.5: Nummerierung der Schrauben

4.3.1 Verlauf

Alle Tiere der Versuchsgruppe der mit mesenchymalen allogenen Stammzellen besiedelten Scaffolds (insgesamt 11 Tiere) wurden mit dem fpvCT untersucht. Es wurde immer ein Scan mit und ein Scan ohne Kontrastmittelapplikation vorgenommen (siehe Abschnitt 3.4.2, Seite 26). Der erste Scan wurde zwei Wochen, der zweite vier Wochen postoperativ durchgeführt. Danach wurden die Kaninchen der 4 Wochen-Versuchsgruppe getötet (insgesamt zwei, eins mit Scaffold coated und eins mit Scaffold coated and loaded). Ab dann wurden die Untersuchungen im fpvCT in vierwöchigen Abständen vorgenommen. Drei Tiere konnten auf Grund eines Versagens der Osteosynthese nicht in die Auswertung aufgenommen werden. Im weiteren Verlauf starben vier Tiere während oder kurz nach der Kontrastmittelapplikation beim fpvCT. Zwei Tiere, jeweils eines mit Scaffold coated und eines mit Scaffold coated and loaded, konnten über den gesamten Versuchszeitraum von 20 Wochen

untersucht werden. Daraus resultieren folgende Untersuchungszeitpunkte (siehe Tabelle 4.2).

Es fällt die Häufung von Osteosyntheseversagern in der Gruppe „coated and loaded“ und der Kontrastmittelkomplikationen in der Gruppe „coated“ auf. Wie im folgenden beschrieben, scheinen dies jedoch zufällige Effekte aufgrund der sehr kleinen Versuchsgruppen zu sein (siehe Abschnitt 4.3.3, Seite 45; Abschnitt 5.3.1, Seite 78; Abschnitt 5.1.2, Seite 69).

	Zeitpunkt des fpvCTs post-OP (w)					
Nummer	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>8</i>	<i>12</i>	<i>16</i>	<i>20</i>
<i>Scaffolds coated</i>						
00154	ja	ja	Versuchszeitraum 4 Wochen			
00155	ja	ja	ja (+)	-	-	-
00099	ja	ja	ja (+)	-	-	-
00092	ja	ja	ja	ja	ja (+)	-
00152	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>Scaffolds coated and loaded</i>						
00072	ja	ja	Versuchszeitraum 4 Wochen			
00173	ja	ja	(++)			
00086	ja	ja	(++)			
00151	ja	ja	ja	(++)		
00156	ja	ja	ja	ja (+)	-	-
00157	ja	ja	ja	ja	ja	ja

Tabelle 4.2: Versuchzeiträume nach Scaffoldart; (+) = an diesem fpvCT-Termin nach KM-Gabe verstorben; (++) = Osteosyntheseversagen, keine KM-Gabe

4.3.2 Darstellungsmöglichkeiten und Artefakte

Die Datensätze der fpvCT-Untersuchungen wurden an der Workstation in der Maximum Intensity Projection ausgewertet (siehe Abschnitt 3.4.2, Seite 26). Zuerst wurde das dreidimensional rekonstruierte Femur betrachtet und dann die Schnittbilder parallel, senkrecht und axial zur Platte. Auf Grund der isotropen Voxel war es möglich, jede andere beliebige Schnittebene ohne Bildqualitätsverlust einzustellen.

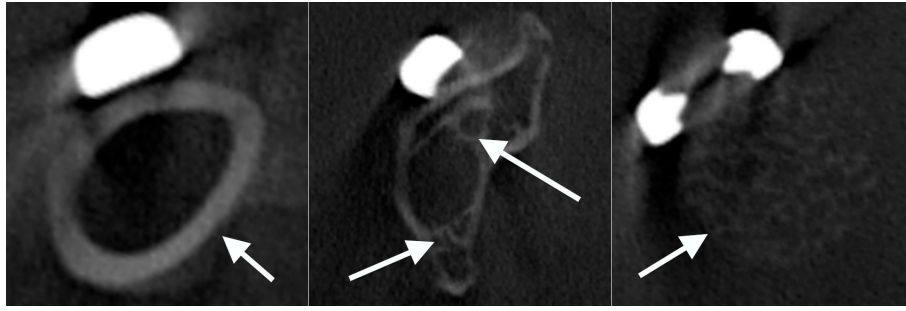


Abbildung 4.6: Präparat 4 Wochen postoperativ, allogen besiedelt, coated: Darstellung von Kortikalis (links, Pfeil), trabekulärem Knochen im Schenkelhals (mitte, Pfeile) und Scaffold (rechts, Pfeil)

Die Darstellbarkeit von Knochen erwies sich als sehr gut (siehe Abbildung 4.6): Neben der Kortikalis konnten auch trabekuläre Strukturen genau betrachtet werden. In den Schnittbildern waren selbst feinste Risse im Knochen und Veränderungen der Knochenstruktur gut erkennbar. Das Scaffold war vor allem zu Beginn klar abgrenzbar und in seiner Struktur gut zu erkennen. Die Auflösung war jedoch zur Differenzierung von neu gebildeter Knochenmatrix von der Umgebung nicht hoch genug. Also konnte die Aktivität der angesiedelten Osteoblasten mittels fpvCT nicht belegt werden. Des weiteren war die Differenzierung zwischen Knochen und Scaffold im späten Stadium der Degradation und des Knocheneinwachsens in den Osteotomiespalt schwierig.

Artefakte

Insgesamt entstanden nur geringe Artefakte durch das Osteosynthesematerial. Vor allem die Region um die Platte war durch Schattenbildung des Osteosynthesematerials in den plattenparallelen Schnitten schwer zu beurteilen (siehe Abbildung 4.7, Seite 44).

In den axialen und den Schnitten senkrecht zur Platte war die Darstellung der Region direkt unterhalb der Platte problemlos möglich, jedoch wurden hier Schatten der Schrauben abgebildet. Von Schrauben und Platte gingen außerdem strahlenförmige Artefakte in einem immer gleichen Muster aus (siehe Abbildung 4.8, Seite 45). Dies schränkte die Beurteilbarkeit aber nicht wesentlich ein. Nur die Beurteilung des Knochenwachstums direkt neben und über der Platte wurde dadurch behindert.

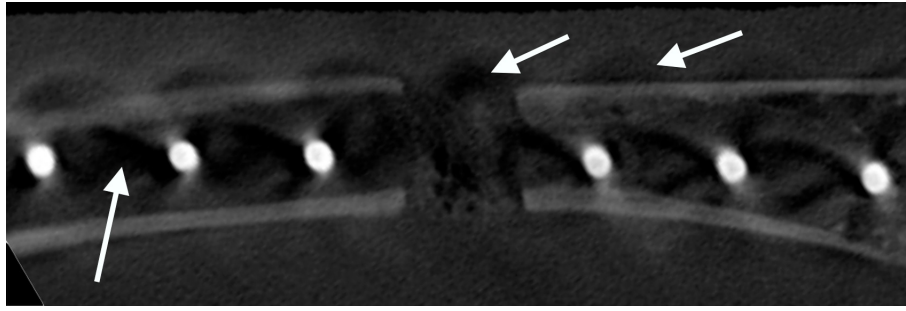


Abbildung 4.7: Präparat 4 Wochen postoperativ, allogene Besiedelung, beschichtet: Schattenartefakt der Platte als Aufhellung in einem plattenparallelen Schnitt knapp unterhalb der Platte (Pfeile)

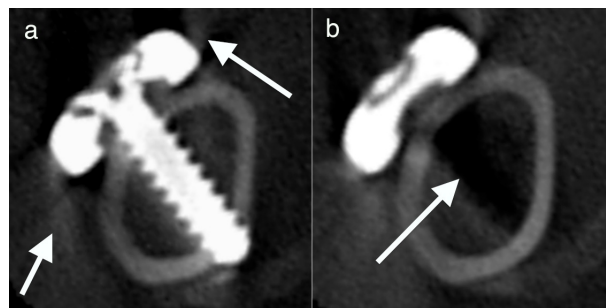


Abbildung 4.8: Präparat 4 Wochen postoperativ, allogene Besiedelung, beschichtet: Die Artefakte sind deutlich zu erkennen: Links die Strahlenbildung v.a. durch die Platte (a, Pfeile) und rechts die Schattenbildung durch die Schraube (b, Pfeil)

4.3.3 Osteosynthese

Auf Grund der vorgegebenen Länge der Osteosyntheseplatten und den minimal variierenden Femurlängen war die Anpassung bei manchen Operationen problematisch. Die Platten waren teilweise minimal zu lang für das Femur, so dass sie distal auf den Kniekondylen zum Liegen kamen. Daraus resultierte ein Abstand von bis zu einem Millimeter zwischen distalem Femurteil und distaler Platte. Es bestand jedoch keine Möglichkeit die Länge der Platte der Femurlänge anzupassen. Dies war bei 5 von 11 Tieren der Fall (45,5%). Bei keinem der Tiere kam es zu sichtbarer Osteosyntheseinstabilität.

Neben drei totalen Osteosyntheseinstabilitäten (Schraubenausriss, siehe unten) kam es bei einem Tier (00152, coated) im Verlauf zu einem Abknicken der Platte um ca. 10 Grad. Wegen der nur geringen Achsabweichung konnte das Tier trotzdem in die Auswertung aufgenommen werden.

Haarrisse und Osteosyntheseversagen

Bei acht von elf Kaninchen (73%) traten Haarrisse von den Schraubenein- und/oder Austrittsstellen ausgehend auf. In fünf Fällen gingen sie von der Schraube distal und proximal des Osteotomiespaltes aus und zogen in diesen hinein (siehe Abbildung 4.9). Hier fand sich aber keine sichtbare Einschränkung der Osteosynthesestabilität.

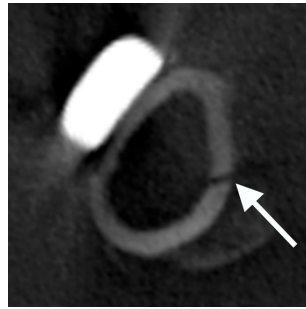


Abbildung 4.9: Präparat 4 Wochen postoperativ, allogene besiedelt, coated: Haarriss an typischer Stelle: Von der Austrittsstelle der Schraube Nr. 3 zum Osteotomiespalt ziehend (Pfeil)

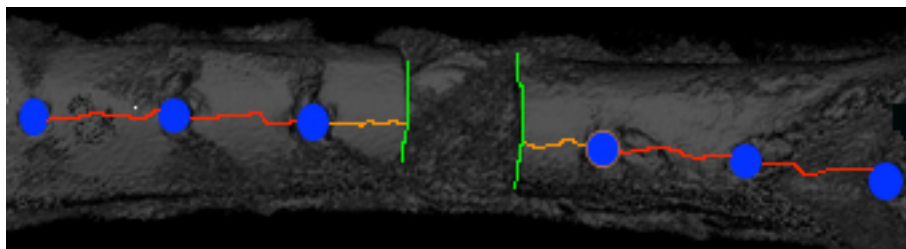


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung der Schraubenausrisssstellen und dort auftretender Risse: Die Schraubenaustrittsstellen sind blau, dargestellt, die Osteotomiestellen grün. Wenn von der Osteotomie zur 3. bzw. 4. Schraube Haarrisse zogen (hier orange dargestellt), kam es nicht zu einem Versagen der Osteosynthese. Zogen die Risse jedoch von der Osteotomie bis zu den Schrauben 1 bzw. 6 (hier rot) kam es im Verlauf immer zum Ausreißen der Schrauben und zum Versagen der Osteosynthese.

Bei drei Tieren zogen sie sich über die gesamte Länge des betroffenen Femurteils und es kam zum Osteosyntheseversagen. Bei allen drei Tieren war das Femur entlang der Ein- und Austrittsstellen der Schrauben bis zum Osteotomiespalt gespalten, es kam zu einer starken Erweiterung der Schraubenlöcher. Dadurch fehlte den Schrauben der nötige Halt, sie rissen aus (siehe Abbildung 4.11, Seite 47). Der betroffene Femurteil dislozierte in den Osteotomiespalt hinein und zerstörte das Scaffold (siehe

Abbildung 4.12, Seite 48). Zweimal war der distale Femurteil betroffen, einmal der proximale.

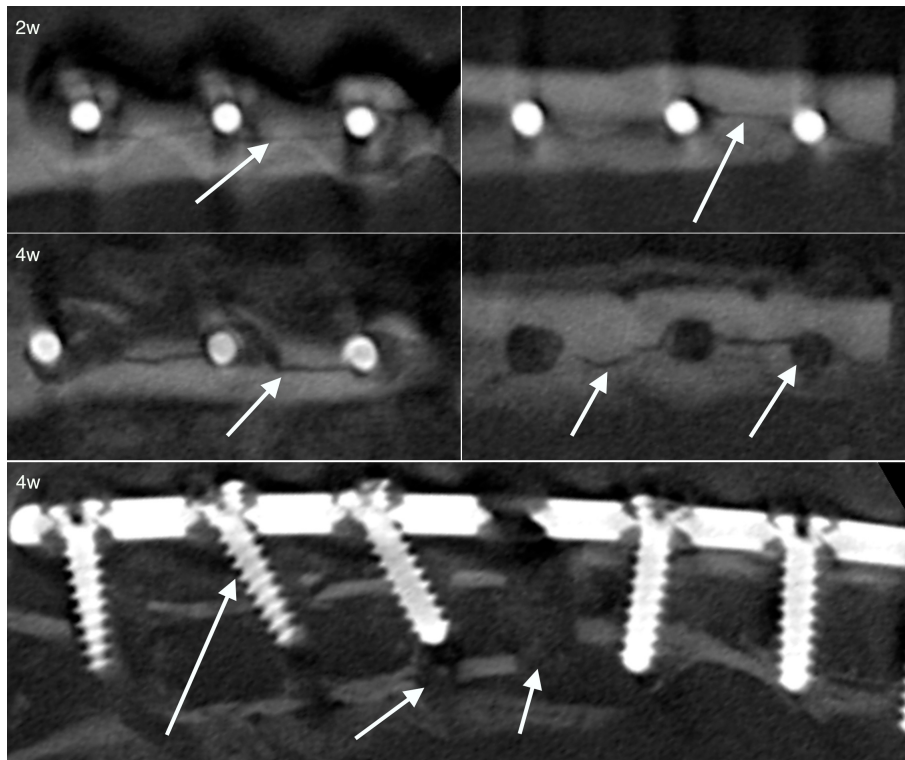


Abbildung 4.11: Präparat allogene besiedelt, coated: Nach zwei Wochen sind die Haarrisse am distalen Femurteil an Schraubenein- (oben links, Pfeil) und Austrittsstellen (oben rechts, Pfeil) deutlich zu erkennen. Nach vier Wochen sind die Schraubekanäle stark erweitert und die Schrauben ausgerissen (Mitte links und rechts, Pfeile), der Femurteil disloziert und der Osteotomiespalt komprimiert (unten, Pfeile)

Ein weiteres Femur wies in der ersten fpvCT-Untersuchung einen den gesamten proximalen Femur entlang ziehenden Haarriss auf. Dieser war jedoch nicht mit den Schraubenein- oder Austrittsstellen verbunden, sondern lag um 90 Grad versetzt anteromedial am Femur. Im Verlauf kam es zu keiner Instabilität, der Haarriss wurde dagegen kürzer.

Knochenabsplitterungen

Es kam bei allen Tieren zu Absplitterungen der Kortikalis an den Schraubenaustrittsstellen (vor allem an den Schrauben 3-5). Auch kam es zu einer spangenförmigen Abhebung des Periosts/der Kortikalis distal des Osteotomiespaltes, ebenfalls an den Schraubenaustrittsstellen (siehe Abbildung 4.13, Seite 48).

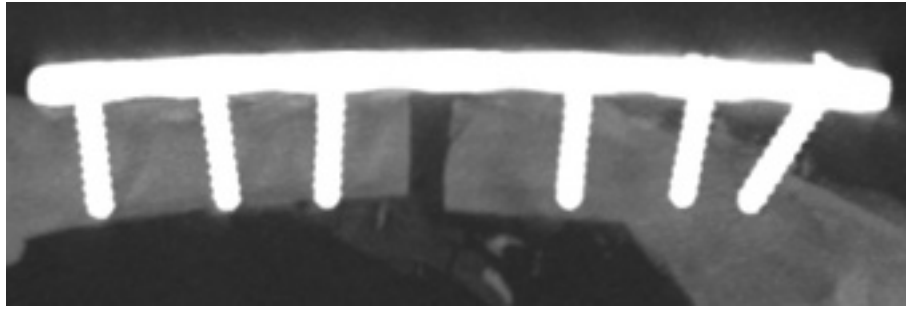


Abbildung 4.12: Präparat 4 Wochen postoperativ, allogene besiedelt, coated and loaded: Ausriss der Schrauben aus dem proximalen Femurteil in der dreidimensionalen Rekonstruktion dargestellt. Deutlich ist auch hier die Dislokation in den Osteotomiespalt (rechts proximal)

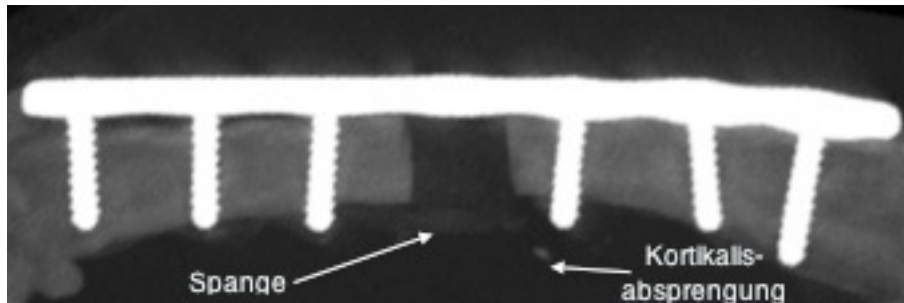


Abbildung 4.13: Präparat allogene besiedelt, coated and loaded: Abgehobenes Periost am distalen Femurteil, hier reicht die Spangenbildung von distal nach zwei Wochen schon fast an die proximale Femuranastomose, deutlich zu erkennen auch die Kortikalisabsprengung von Schraube Nr. 3 (rechts proximal, links distal)

4.3.4 Scaffold

Das Scaffold war zu Beginn in allen Aufnahmen sehr gut zu erkennen und vom umgebenden Knochen/Bindegewebe abzugrenzen. Bei allen Tieren war das Scaffold korrekt im Osteotomiespalt positioniert und lag an der proximalen und distalen Femuranastomose an (siehe Abbildung 4.14, Seite 49). Des Weiteren quoll das Scaffold aus dem Osteotomiespalt heraus. Es kam zu keinem rapiden Schrumpfen des Implantats nach dem Einsetzen und es war keine Reaktion des Gewebes um das Scaffold im Sinne einer Fremdkörperreaktion darzustellen. Hier hätte man zum Beispiel eine exsudativen Fremdkörperreaktion mit Abszess um das Implantat oder eine chronische entzündliche Reizung des Knochens mit Resorption und reaktiver Sklerose erwartet.

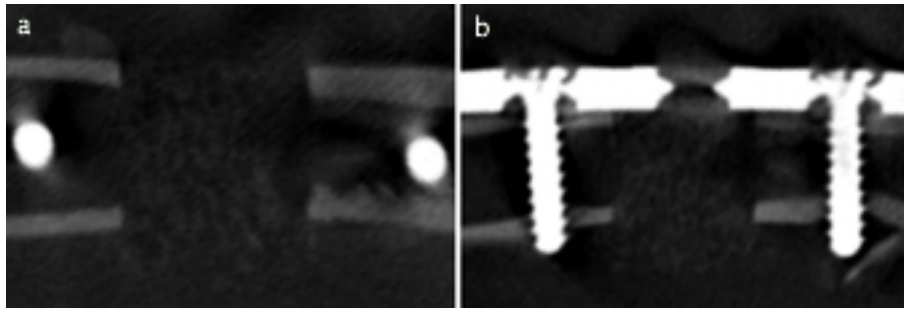


Abbildung 4.14: Scaffold allogene besiedelt, coated and loaded, 2 Wochen postoperativ im Osteotomiespalt: Im coronaren (links) und sagittalen (rechts) Schnitt liegt es den Schnittkanten an, befindet sich direkt unter der Platte und quillt nach posteriomedial aus dem Osteotomiespalt heraus

Lufteinschlüsse

Bei drei von acht (37,5%) Kaninchen fielen beim fpvCT zwei Wochen nach der Operation Lufteinschlüsse im Scaffold auf. Zwei Scaffolds vom Typ coated und ein Scaffold vom Typ coated and loaded, so dass hier kein Zusammenhang zwischen Lufteinschlüssen und Scaffoldart naheliegt. Diese waren zwei Wochen später im fpvCT nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 4.15). Bei keinem der Tiere entwickelte sich eine Infektion.

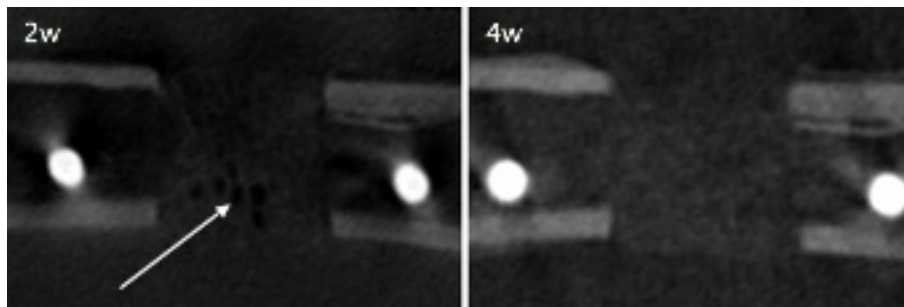


Abbildung 4.15: Präparat allogene besiedelt, coated: Nach zwei Wochen (links, Pfeil) sind Lufteinschlüsse im Scaffold zu erkennen, nach vier Wochen (rechts) sind sie nicht mehr nachweisbar

Degradation

Auf Grund der exzellenten Darstellbarkeit des Scaffolds im Osteotomiespalt konnten auch Veränderungen der Scaffolds im Zeitverlauf sehr gut dargestellt werden. Der Prozess lief immer gleich ab: Beim ersten fpvCT zwei Wochen postoperativ

war die Architektur des Scaffolds sehr gut darstellbar. Der Aufbau aus miteinander verbundenen, makroporösen Poren war optimal einzusehen. Das Scaffold war im gesamten Osteotomiespalt gleichmäßig röntgendicht, jedoch deutlich weniger als der kortikale Knochen. Nach vier bis acht Wochen kam es zur einer Vergröberung bzw. Verplumpung der Struktur. Der Aufbau des Scaffolds wurde unregelmäßiger, es gab Regionen höherer und niedrigerer Dichte. Außerdem war das Scaffold leicht geschrumpft und entrundet, füllte aber noch den Osteotomiespalt aus. Bei der nächsten fpvCT-Untersuchung war das Scaffold deutlich verkleinert und meist in seiner Struktur nicht mehr erkennbar. Noch später waren nur noch Restpartikel im Osteotomiespalt zu erkennen, von denen im fpvCT nur noch vermutet werden konnte, dass sie Scaffoldreste waren (siehe Tabelle 4.3, Seite 51).

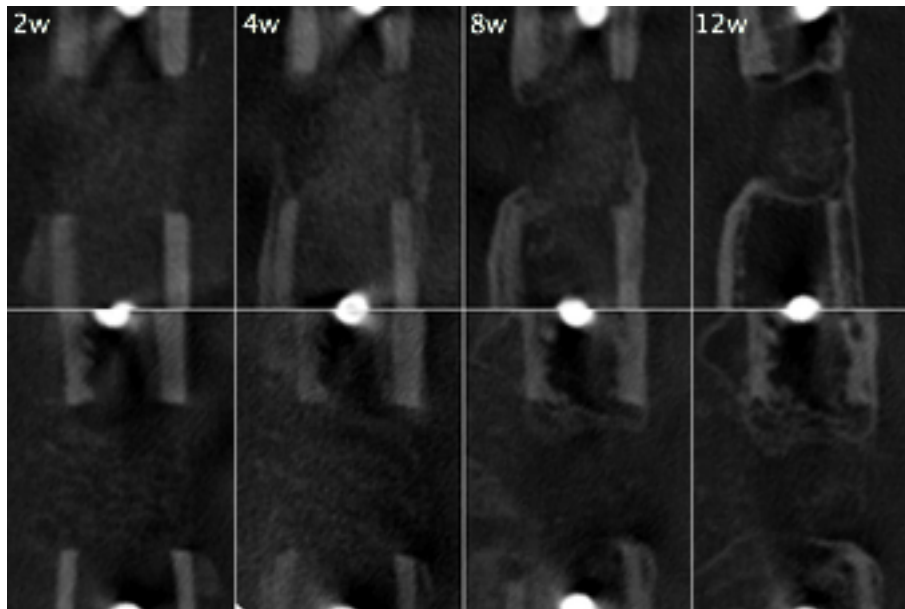


Abbildung 4.16: Oben Scaffold coated und unten Scaffold coated and loaded nach 2, 4, 8 und 12 Wochen: Man erkennt deutlich den früheren Beginn der Veränderung des unteren Scaffolds

Dabei fiel ein Unterschied zwischen den Scaffolds coated und den Scaffolds coated and loaded auf: Während bei den Scaffolds coated erst nach zwei Monaten deutliche Veränderungen zu beobachten waren, wurden gleiche Phänomene bei den Scaffolds mit einer zusätzlichen nanoporösen Kalziumphosphatpartikelschicht (coated and loaded) schon nach einem Monat beobachtet (Abbildung 4.16 und Tabelle 4.3, Seite 51). Es liegt die Vermutung nahe, dass diese beobachteten Veränderungen einer Degradation entsprechen. Dies konnte jedoch mittels fpvCT nicht eindeutig belegt werden, da die verschiedenen Kalziumphosphatphasen nicht voneinander zu

unterscheiden sind. Des weiteren ist das PLGA im Scaffold Mangels Röntgengedichte gar nicht darstellbar. Es könnte sich also auch um eine Schrumpfung des Scaffolds im Zeitverlauf handeln.

	Veränderungen Scaffold	
Zeit(w)	<i>coated</i>	<i>coated and loaded</i>
2	keine	keine
4	keine	Scaffold verkleinert, vergrößert
8	Scaffold verkleinert, vergrößert	deutliche Verkleinerung
12	deutliche Verkleinerung	Reste verbleiben
16	Reste verbleiben	evtl. noch Reste erkennbar
20	evtl. noch Reste erkennbar	

Tabelle 4.3: Veränderungen der Scaffolds, Zeit post-OP

Im fpvCT konnte keine knöcherne Verbindung zwischen Scaffold und einwachsenden Knochen gezeigt werden. Im Verlauf entstanden in allen Scaffolds Sklerosezonen, es war mit dieser Methode jedoch nicht differenzierbar, ob es sich um Kalziumphosphatanteile des Scaffolds oder neugebildete Knochenmatrix handelte (siehe Abschnitt 4.3.6, Seite 54). So konnte folglich die Osteokonduktivität der Scaffolds nicht belegt werden.

4.3.5 Gefäßversorgung

Um die Gefäßversorgung in und um den Knochen darzustellen und eventuelle Gefäßproliferationen nachweisen zu können, wurden neben den Nativaufnahmen an jedem Termin zusätzliche Kontrastmittelaufnahmen angefertigt. Es war jedoch nicht möglich, kleine Gefäße im Bereich des Femurs und Gefäßproliferationen darzustellen. Auch aufgrund der Todesfälle nach Kontrastmittelapplikation wurde diese Untersuchungsmethode nach 16 Wochen eingestellt.

Auf der anderen Seite wurde bei keinem Tier eine zentrale Nekrose nachgewiesen. Es waren bei allen Scaffolds Gangbildungen nachweisbar, die auf einwachsende Gefäße hindeuten könnten. Diese Gänge könnten jedoch auch anderen Ursprungs gewesen sein, z.B. durch Degradation oder Infektion bedingt.

4.3.6 Heilungsprozess und Knochenwachstum

Auf Grund der schon oben beschriebenen detaillierten Darstellbarkeit des Knochens im fpvCT konnten der Heilungsprozess und das Wachstumsverhalten genau nachvollzogen werden. Es kam bei keinem der Versuchstiere zu einem knöchernen Schluss des Defekts, jedoch fielen wiederkehrende Wachstumsmuster auf.

Knochenspangen

Wie oben schon beschrieben, kam es bei allen Tieren zu Knochenabsplitterungen an den Schraubenaustrittsstellen und auch zu spangenförmigen Abhebungen des Periosts distal des Osteotomiespaltes (siehe 4.3.3, Seite 47). Manche Knochenabsplitterungen führten zu extraossären Verknöcherungen, jedoch ohne Vergrößerungstendenz. Das distal des Osteotomiespaltes abgehobene Periost verknöcherte und eine schmale Knochenspange wuchs immer und ausschließlich nach proximal in Richtung des Osteotomiespaltes.

Von acht Tieren entwickelten alle die oben beschriebene Spangenbildung von distal nach proximal ziehend. Die Hälfte der Kaninchen (vier) konnten mit diesen Spangen den Defekt außerhalb des Knochens und Scaffold überbrücken, es kam jedoch nicht zum Zusammenschluss mit dem proximalen Teil des Femurs. Dabei lag die Spange dem Scaffold zu Beginn sehr nah an. Ein minimaler Restspalt zwischen Knochenspange und proximalen Femur blieb immer erhalten. Bei den anderen Versuchstieren reichten die Spangen nicht über den Osteotomiespalt, bei einem war sie zu einem Drittel, bei zwei weiteren zu zwei Dritteln über den Osteotomiespalt gewachsen. Meist lagen die Spangen posterio-medial des Femurs, also genau gegenüber der Platte (siehe Abbildung 4.17, Seite 53). Die Phase des stärksten Wachstums der Knochenspangen war in den ersten acht Wochen. Danach veränderte sich ihre Länge nur noch minimal.

Von den proximal des Osteotomiespaltes abgesplitterten Knochen kam es nie zu einem Wachstum über den Osteotomiespalt. Bei vier Tieren kam es zu diesen proximalen Absplitterungen (an Schraube Nr. 3). Hier wuchs der abgesprengte Knochen nicht stark wie distal des Osteotomiespaltes, sondern wurde in 3 von 4 Fällen abgebaut. Nur in einem Fall wurde der Knochen minimal weiter aufgebaut (siehe Abbildung 4.17, Seite 53).

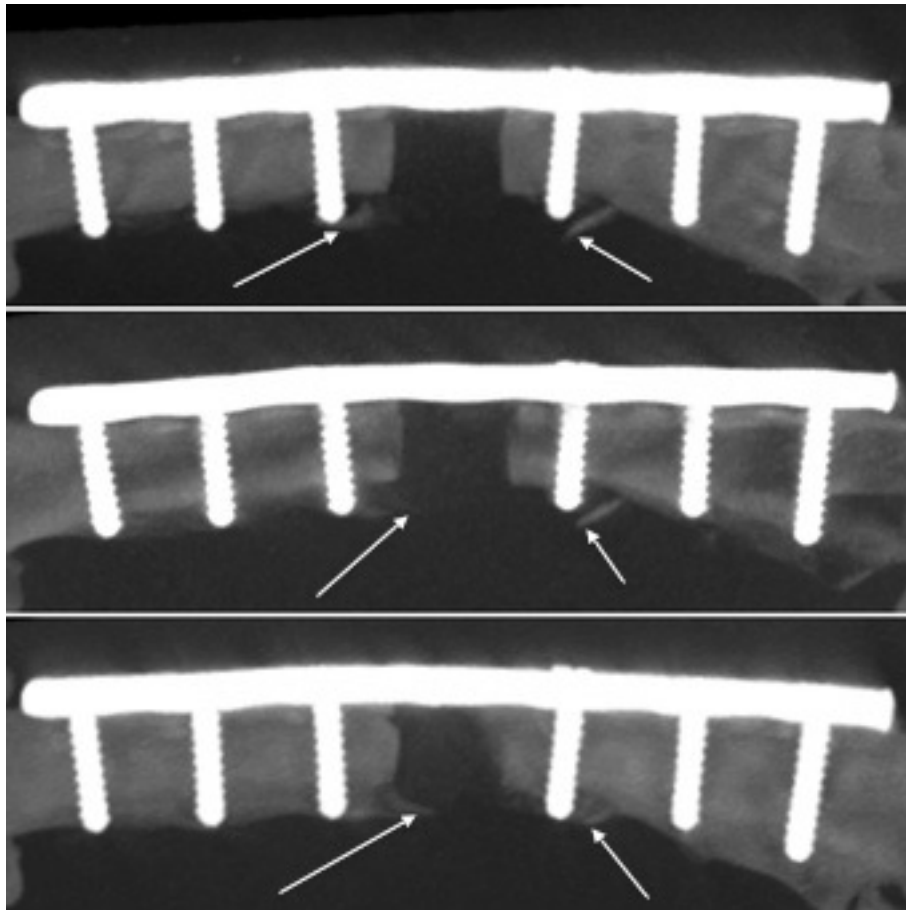


Abbildung 4.17: Femur mit Scaffold allogren besiedelt, coated and loaded im Zeitverlauf nach zwei (oben), vier (mitte) und acht (unten) Wochen: Die Spange von distal wächst über den Osteotomiespalt während das proximale Knochenstück abgebaut wird (s. Pfeile, rechts proximal, links distal)

Knochenbildung im Osteotomiespalt

Neben diesem Knochenwachstum außerhalb des Osteotomiespalt und des Scaffolds kam es bei allen Tieren zum Einwachsen von Knochen in den Osteotomiespalt.

Schon zwei Wochen postoperativ war eine Proliferationsreaktion des Endosts an der proximalen Femuranastomose zu beobachten (bei 7 von 8, 87,5%). Wachstum von Knochen in den Osteotomiespalt begann 4 Wochen nach der Operation (4 von 8, 50%) - monokortikal direkt unterhalb der Platte von proximal. Zu diesem Zeitpunkt waren bei allen Tieren (8 von 8) endostale und augenscheinlich periostale Reaktionen an der proximalen Femuranastomose nachweisbar. Vom Periost gingen feine, knöcherne Bänder aus, bei zwei Tieren auch von der distalen Femuranastomose (2 von 8, 25%)

Acht Wochen postoperativ waren bei allen untersuchten Tieren an beiden Anastomosen endostale und periostale Reaktionen und Knocheneinwuchs in den Osteotomiespalt von proximal und distal nachweisbar (6 von 6, 100%). Das Wachstum erfolgte stärker von proximal. Egal ob von proximal oder distal, am meisten Knochen bildete sich direkt unterhalb der Platte. Bei drei Tieren (3 von 6, 50%) schlugen die feinen, vom Periost ausgehenden Knochenbänder nach innen in Richtung Markraum um. Am meisten Knochen wurde in den Wochen 8 bis 12 gebildet. In diesem Zeitraum wurde bei den vier verbliebenen Tieren fast ein knöcherner Schluss direkt unterhalb der Platte erreicht, eine winzige Lücke blieb jedoch immer bestehen. Die restlichen zwei Drittel des Osteotomiespales blieben - radiologisch gesehen - leer, bzw. mit Scaffoldresten gefüllt. Die vom Periost ausgehenden Knochenbänder bildeten nun - nach 12 Wochen - Kappen über den Markräumen und schlossen sie so bei allen vier Tieren zu über 80% ab. Danach war bei den verbleibenden Tieren (eins für weitere vier, zwei für weitere acht Wochen) bis zum Versuchsende nur noch sehr geringes Wachstum im Osteotomiespalt zu beobachten (siehe Abbildung 4.18, Seite 55).

Der in den Osteotomiespalt einwachsende Knochen schien - obwohl in der Operation das Periost abpräpariert wurde - immer vom Endost und Periost der Femuranastomosen auszugehen.

Um auf Knochenbildung im Scaffold schließen zu können, wurde auf Sklerosezonen geachtet. Im Scaffold konnten bei sechs von acht Kaninchen im Verlauf des Versuches, aber immer vor Beginn der Degradation, Sklerosen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.19, Seite 56). Diese waren sehr klein und im Scaffold gleichmäßig verteilt. Solche Verschattungen ließen die Vermutung auf neugebildete Knochenmatrix zu, jedoch kommen auch verschiedene andere Möglichkeiten in Betracht (siehe Diskussion „Zellbesiedelung und Kalzifizierung“, Kapitel 5.4.1, Seite 87). Nach Beginn der Degradation konnten bei allen verbliebenen Tieren (6 von 6) deutliche Sklerosezonen im Scaffold mit dem fpvCT nachgewiesen werden. Knochenbildung im Scaffold konnte aber nicht eindeutig gezeigt werden, eine Differenzierung der Verschattungen war nicht möglich.

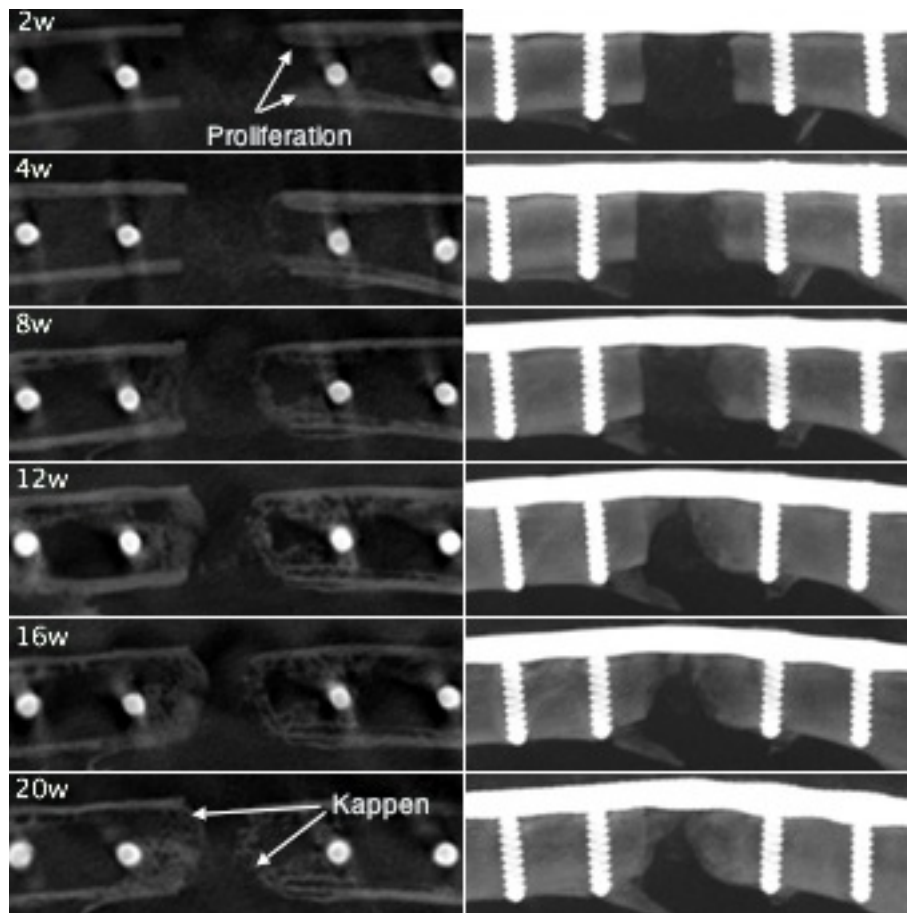


Abbildung 4.18: Präparat allogene besiedelt, coated and loaded: Wachstumsverlauf in coronaren Schnitten (links) und dreidimensionaler Rekonstruktion (rechts) im zeitlichen Verlauf (zwei bis 20 Wochen von oben nach unten): Zuerst kommt es zu endostalen Proliferationen, dann Wachstum von Peri- und Endost aus mit Kappenbildung, stärkstes Wachstum zwischen vier und zwölf Wochen postoperativ, danach kaum noch Progress (rechts proximal, links distal)

Remodeling

Es kam nicht nur zu Knochenneubildung im und um den Osteotomiespalt. Auch der „alte“ Knochen veränderte sich und wurde vor allem rund um den Osteotomiespalt einem starken Umbauprozess unterzogen („Remodeling“). Besonders betroffen waren die Bereiche um Schrauben und Platte.

Zuerst kam es zu oben beschriebener Proliferation des Endosts um die dritte Schraube (bei sieben von acht Kaninchen nach zwei Wochen, siehe Abschnitt Knochenbildung im Osteotomiespalt, Seite 53). Des weiteren zeigte sich früh eine vermehrter Anbau von Knochen um die Schraubeneintrittsstellen. Zuerst geschah dies am proximalen Femurteil, nach acht Wochen war bei allen Tieren sowohl am

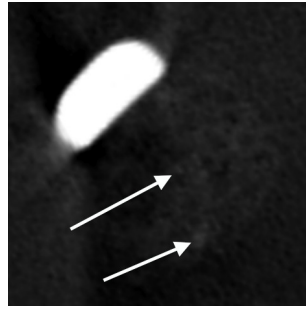


Abbildung 4.19: Präparat allogenes besiedelt coated: Eine größere und mehrere kleinere Sklerosezonen in diesem Scaffold zwei Wochen postoperativ (s. Pfeile, axialer Schnitt)

proximalen, als auch am distalen Teil eine vermehrte Knochenbildung um die Eintrittsstellen zu beobachten (siehe Abbildung 4.20, Seite 57). Bei allen Tieren kam es auch zu einem Anbau um die Schraubenaustrittsstellen und die die Kortikalis durchstossende Schraubenspitze. Hier waren die vier Schrauben um den Osteotomiespalt (Nr. 2-5) am häufigsten betroffen, allerdings ohne eindeutiges zeitliches Verteilungsmuster.

Ein anderes Phänomen war die Knochenbildung um die Osteosyntheseplatte. Bei allen Tieren kam es im Verlauf zum Wachstum des Knochens um die Platte, jedoch wurde die Platte nie von Knochen komplett eingeschlossen. Das Wachstum betraf vor allem die schmalen Plattenabschnitte zwischen den Schraubenlöchern (siehe Abbildung 4.20, Seite 57). Das genaue Ausmaß war wegen der oben beschriebenen Artefakte durch die Platte schwierig zu beurteilen. Es ließ sich kein regelmäßiges Muster beschreiben. Des weiteren kam es bei allen Osteosynthesen (insgesamt fünf, siehe Abschnitt 4.3.3, Seite 45), bei denen die Platte am distalen Femurteil nicht direkt dem Knochen auflag, zu Bildung von Knochen zwischen Femur und Platte.

Um den Osteotomiespalt kam es zu den stärksten Veränderungen am Knochen. Eine sehr starker Knochenanbau fand immer um die Schrauben Nummer 3 und 4, also direkt proximal und distal des Osteotomiespalts statt. Zuerst proximal, nach vier bis acht Wochen dann auch am distalen Femurteil kam es hier zu einer endostalen Reaktion (siehe oben) und Bildung von Knochen um die Schrauben 3 und 4, teilweise bis zum Osteotomiespalt ziehend. Daraus bildete sich im Verlauf eine mehrschaliger Körper, also mehrschichtig zirkulär aufgebauter Knochen. Diese Proliferation war in ihrer Stärke bei den verschiedenen Tieren sehr unterschiedlich ausgeprägt: Bei

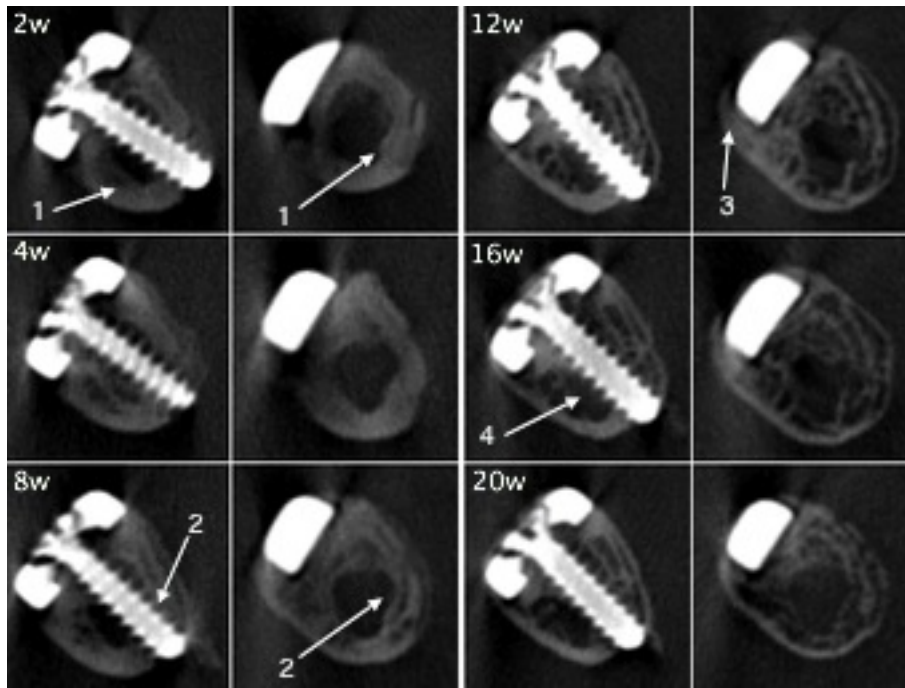


Abbildung 4.20: Präparat allogene besiedelt, coated: Remodeling um Schraube Nr. 3 (linke Spalten) und 2mm weiter distal zum Osteotomiespalt (rechte Spalten) im Verlauf des Versuchs (von zwei (oben, linke Hälfte) bis 20 Wochen postoperativ (unten, rechte Hälfte)): Von der anfänglichen endostalen Verdickung (1) bis zum mehrschaligen Körper (4), die verstärkte Knochenbildung um Schrauben ein- und Austrittsstelle ist deutlich zu erkennen (linke Spalten (2)), auch die Knochenbildung um die Platte an den schmalen Stellen (rechte Spalten (3))

manchen wurde der Markraum komplett ausgefüllt, bei anderen war nur eine sehr diskrete Reaktion zu beobachten (siehe Abbildung 4.20). Drei Tiere zeigten eine Lyse der Kortikalis: Eines an der Kortikalis der distalen Femuranastomose gegenüber der Platte, ein anderes an der Kortikalis der distalen Femuranastomose direkt unter der Platte und ein drittes an der Kortikalis proximal und distal des Osteotomiespalt.

Osteolysen in der Kortikalis direkt unterhalb der Platte traten bei zwei weiteren Tieren im späteren Verlauf des Versuchs auf, jedoch nicht am Osteotomiespalt. So war bei einem Tier die Kortikalis direkt unter der Platte des proximalen und bei dem anderen die Kortikalis direkt unter der Platte des distalen Femurteils betroffen.

4.3.7 Zusammenfassung

Durch die hohe Auflösung und die Technik der isotropen Voxel konnte praktisch jeder Teil des Femurknochens im Verlauf der Versuchszeit dargestellt werden. So ließen sich wichtige Erkenntnisse über das Scaffold, die Osteosynthese und das Knochenwachstum gewinnen, auch konnte keine zentrale Nekrose nachgewiesen werden. Ein Nachweis von Gefäßproliferationen im Scaffold gelang jedoch nicht. Auch war keine Differenzierung zwischen Kalziumphosphatphase des Scaffolds und neu gebildetem Knochen möglich, so dass nicht bewiesen werden konnte, dass neuer Knochen im Scaffold entsteht.

4.4 μ -CT

Bei allen Tieren wurde post mortem ein μ -CT durchgeführt. Mit dieser Methode konnten erstmals die Gruppen miteinander (besiedelte Scaffolds vs. unbesiedelte Scaffolds) verglichen werden. Um Artefaktbildung zu verhindern, mussten nach dem Einbetten des Knochens Schrauben und Platten entfernt werden (siehe Abschnitt 3.7, Seite 30). Deswegen konnte nur der Bereich zwischen Schraube drei und vier inklusive des Osteotomiespaltes dargestellt werden.

4.4.1 Scaffold

Die Implantate waren nach vier Wochen noch gut in ihrer Struktur im μ -CT zu erkennen. Bei den Scaffolds coated and loaded zeigten sich jedoch schon erste Degradationszeichen. Sie waren in der Größe leicht vermindert und entrundet, die Dichte war nicht mehr homogen (siehe Abbildung 4.21, Seite 59). Gleichzeitig fanden sich bei allen Scaffolds erste sklerosierte Bereiche.

Nach 12 bzw. 16 Wochen fielen deutliche Unterschiede im Grad des Abbaus auf. Während bei den Scaffolds coated zwar deutliche Zeichen der Degradation zu erkennen waren (verkleinert, entrundet, inhomogen), waren in der Gruppe der Scaffolds coated and loaded nur noch Reste des Implantats auszumachen (siehe Abbildung 4.22, Seite 59). Auf Grund der höheren Auflösung ließ sich aber insgesamt noch länger Scaffold nachweisen als im fpvCT, bei einem Tier mit einem mit MSCs besiedeltem Scaffold coated and loaded sogar noch 20 Wochen postoperativ. Dieser

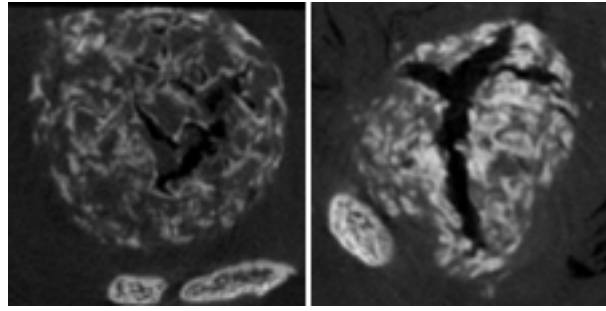


Abbildung 4.21: Scaffolds im μ -CT 4 Wochen postoperativ, axiale Schnitte: Man erkennt die noch gut erhaltene und runde Struktur des Scaffolds coated (links) und die entrundete und verdichtete Struktur des Scaffolds coated and loaded (rechts), beide waren mit allogenen mesenchymalen Stammzellen besiedelt

Befund war im fpvCT nicht erkannt worden (siehe Abbildung 4.23, Seite 60).

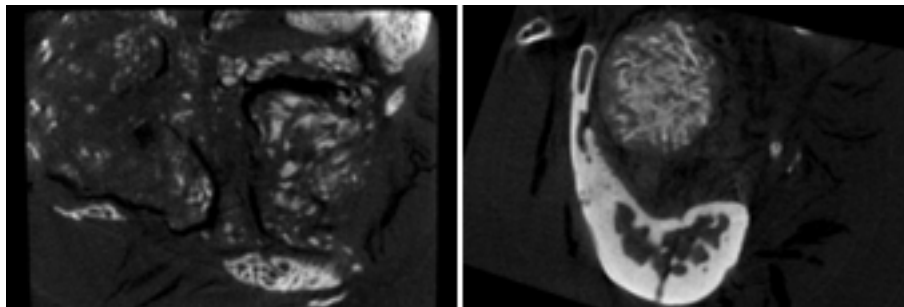


Abbildung 4.22: Scaffolds allogen besiedelt im μ -CT 12 bzw. 16 Wochen postoperativ, axiale Schnitte: Links das Scaffold coated and loaded nach 12 Wochen, es sind nur noch Reste erkennbar. Das Scaffold coated nach 16 Wochen (rechts) ist zwar scheinbar geschrumpft, aber in seiner runden Form noch erhalten. Im μ -CT sind vor allem die vermutlichen Scaffoldreste länger nachweisbar und besser darstellbar (vgl. Abbildung 4.16, Seite 50)

Obwohl sklerosierte Zonen und Veränderungen im Scaffold deutlich besser zu erkennen waren, war es auch hier nicht möglich, neugebildete Knochenmatrix von den Kalziumphosphaten des Scaffolds definitiv zu unterscheiden. Jedoch fielen nach vier Wochen Unterschiede in der Röntgendichte zwischen unbesiedelten und besiedelten Scaffolds auf (siehe Abschnitt 4.4.2, Seite 61). Die Sklerosezonen im Scaffold hatten in diesem Untersuchungsverfahren eine ähnliche Dichte wie der vom Endost gebildete Knochen. Nach 20 Wochen waren nur noch Reste der Scaffolds zwischen dem eingewachsenen Knochen zu erkennen, diese deutlich röntgendichter als nach vier Wochen.

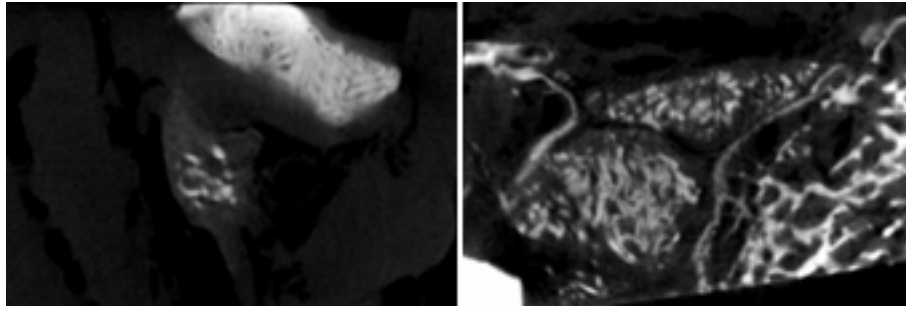


Abbildung 4.23: Scaffolds allogene besiedelt im μ -CT 20 Wochen postoperativ: Links das Scaffold coated, es ist ein Rest mitten im Osteotomiespalt erkennbar (axialer Schnitt). Der Scaffoldrest coated and loaded 20 Wochen (rechts, sagittaler Schnitt) liegt etwas außerhalb des Osteotomiespalt

Es ließen sich keine Gefäße darstellen. Eine Nekrose im Scaffold oder im einwachsenden Knochen konnte nicht gefunden werden.

4.4.2 Knochenwachstum

Auch im μ -CT waren nach vier Wochen an der proximalen Anastomose beginnende endostale und periostale Proliferation zu erkennen (siehe Abbildung 4.24, Seite 61). Nach 20 Wochen wurde nach Herauslösen der Schrauben drei und vier die knöcherne Ummantelung, vor allem der Schraubeneintrittsstelle und der Spitze, deutlich. Auch der trabekuläre Umbau um den Osteotomiespalt (Mehrschalenkörper, siehe Abschnitt 4.3.6, Seite 56) konnte dargestellt werden (siehe Abbildung 4.25, Seite 61). Es fallen unterschiedliche Knochenstrukturen bei den verschiedenen Wachstumsprozessen auf. Die im fpvCT festgestellten Lysen der Kortikalis um den Osteotomiespalt bei drei Tieren zeigten sich auch hier im μ -CT.

Auch bei den unbesiedelten Scaffolds kam es bei keinem Tier zum knöchernen Schluss des Osteotomiespalt. Der in der Projektionsradiographie als geschlossen gesehene Leerdefekt (siehe Abbildung 4.4, Seite 41) war durch eine Knochenspange überbrückt. Zwischen der von distal wachsenden Brücke und der proximalen Anastomose wurde aber kein Schluss hergestellt, es blieb wie bei den anderen Tieren ein schmaler Spalt (siehe Abbildung 4.26, Seite 62).

In dieser Gruppe zeigten sich alle bei der Versuchsgruppe „Scaffolds mit allogenen Zellen besiedelt“ beschriebenen Wachstums- und Remodelingprozesse: Knochenspangen, stärkstes Wachstum des Knochens unter der Osteosyntheseplatte und

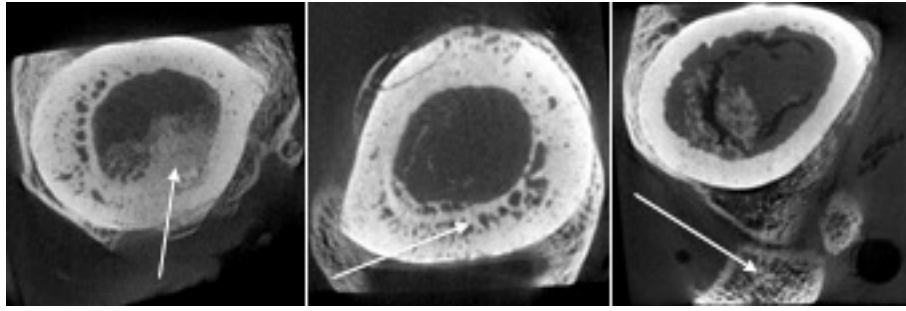


Abbildung 4.24: Präparat allogene besiedelt coated and loaded: Axiale Schnitte des Knochens vier Wochen postoperativ: Man erkennt die starken vom End- und Periost ausgehenden Proliferationen proximal des Osteotomiespaltes (links und mitte) und die verhältnismäßig schwache Reaktion distal des Osteotomiespaltes, hier aber dafür die Spangenbildung von distal (rechts)(s. Pfeile)

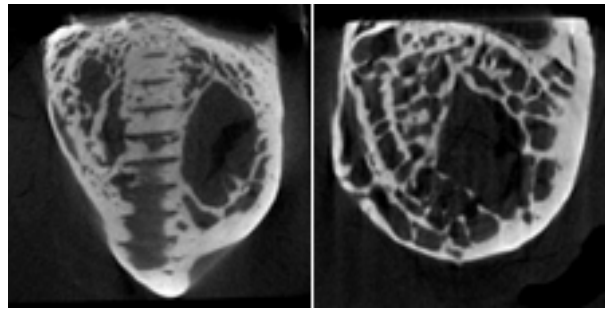


Abbildung 4.25: Axiale Schnitte des Knochens 20 Wochen postoperativ: Nach Herauslösen der Schraube erkennt man den verbliebenen, die Schraube einschließenden Knochen (links, Schraube proximal des Osteotomiespaltes), einige Millimeter weiter distal wird der Knochenumbau zu einem mehrschaligen Körper höherer Festigkeit deutlich (rechts, proximale Femuranastomose)

starkes Remodeling des Knochens um den Osteotomiespalt. Da es sich hier um eine Endpunktanalyse handelt, konnte der Wachstumsprozess in seiner Entwicklung nicht beobachtet werden. Es fiel auf, dass der wachsende Knochen je nach Wachstumsursprung eine unterschiedliche Architektur aufwies.

In der dreidimensionalen Rekonstruktion zeigte sich vier Wochen postoperativ ein deutlicher Unterschied in der Röntgendichte der Scaffolds. Die mit allogenen, mesenchymalen, Stammzellen besiedelten Scaffolds zeigten eine wesentlich höhere Dichte als die unbesiedelten Scaffolds..

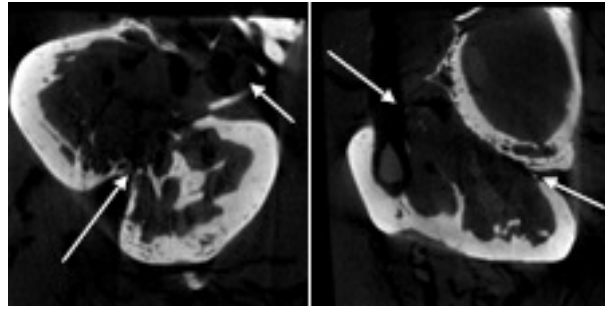


Abbildung 4.26: Präparat unbesiedelt, coated: Axiale Schnitte des Knochens 20 Wochen postoperativ: Bei diesem Leerdefekt war ein knöcherner Schluss der Osteotomie auf Grund des Röntgens vermutet worden, hier im μ -CT kann man den Spalt (s. Pfeile) zwischen den beiden einwachsenden Spangen erkennen. Die Projektion der beiden Spangen ergab im Röntgen eine durchgezogene Kortikalislinie

4.4.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse aus dem fpvCT fanden sich, jedenfalls im dargestellten Bereich, auch im μ -CT. Die in der Gruppe der besiedelten Implantate im fpvCT festgestellten Wachstumsmuster und Remodelingvorgänge zeigten sich in gleicher Form auch bei den unbesiedelten Implantaten. Ein deutlicher Unterschied wurde zwischen den beiden Gruppen in der Kalzifizierung des Scaffolds festgestellt. Es konnte aber mit dieser Methode nicht sicher gezeigt werden, dass es sich bei den Kalzifizierungen im Scaffold um neugebildete Knochenmatrix handelte.

4.5 Histologie

Nach dem μ -CT wurden aus dem eingebetteten Knochen die histologischen Präparate hergestellt. Aufgrund der für das μ -CT nötigen Entfernung des Osteosynthesematerials konnte nur der Osteotomiespalt und die angrenzenden Bereiche dargestellt werden. Beide Versuchsgruppen (unbesiedelt und allogene besiedelt) wurden miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die histologischen Ergebnisse mit denen des μ -CTs und denen des fpvCTs verglichen.

Wichtige bis jetzt unbeantwortete Fragen waren, ob in den Scaffolds Knochen entstand, ob es dabei Unterschiede zwischen den unbesiedelten und besiedelten Scaffolds gab und ob sich Gefäßproliferation nachweisen ließ.

4.5.1 Besiedelte Scaffolds

Nach vier Wochen fanden sich bei beiden Tieren aus der Versuchsgruppe „allogen besiedelt“ Zellen auf der Oberfläche des gesamten Scaffolds (siehe Abbildung 4.27). In den unbesiedelten Scaffolds fanden sich auch Zellen nach vier Wochen, aber deutlich weniger und nur an den Scaffold-Knochen-Grenzen, also in der Scaffoldperipherie (siehe Abbildung 4.28).

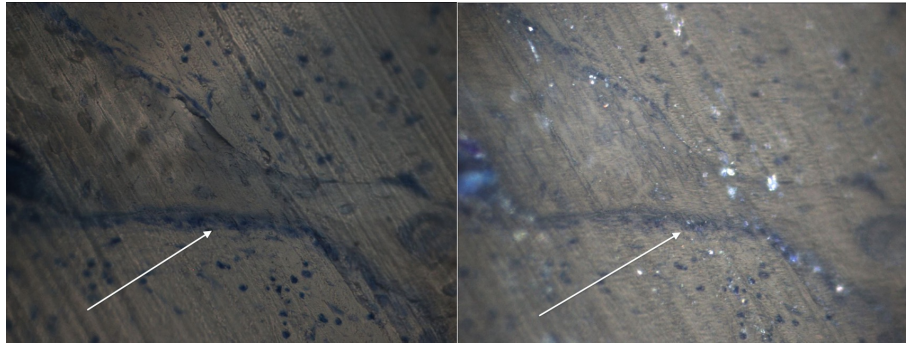


Abbildung 4.27: Mitten im Scaffold eines mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten Scaffolds coated and loaded vier Wochen postoperativ: Deutlich ist eine blaue Linie mit Zellen zu erkennen (s. Pfeile, Durchlicht links, Auflicht rechts, 500x, Toluidinblau)

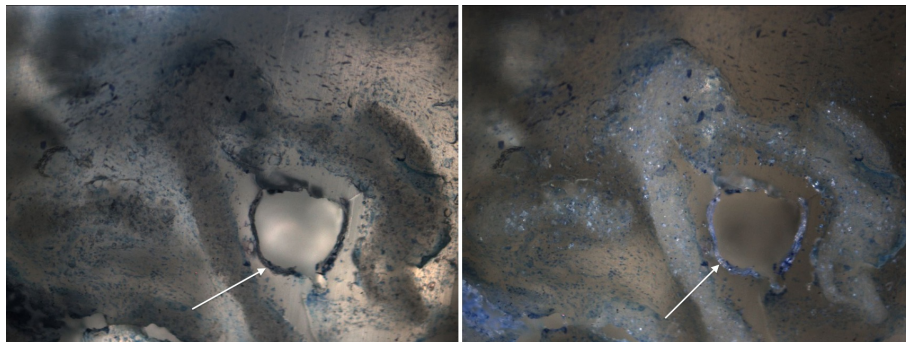


Abbildung 4.28: Scaffold-Knochen-Grenze eines unbesiedelten Scaffolds coated vier Wochen postoperativ: Man erkennt eingewanderte Zellen, aber wesentlich weniger als bei besiedelten Scaffolds (s. Pfeile, Durchlicht links, Auflicht rechts, 100x, Toluidinblau)

4.5.2 Degradation der Scaffolds und Knochenwachstum

In den histologischen Schnitten war vier Wochen postoperativ, unabhängig ob die Scaffolds besiedelt oder unbesiedelt waren, das Implantat in seiner Struktur und

Form noch gut erhalten. Es fanden sich schon nach vier Wochen Osteoklasten im Scaffold (siehe Abbildung 4.29). Nach 20 Wochen war das Scaffold bis auf das PLGA Gerüst abgebaut und teilweise durch Knochen ersetzt (siehe Abbildung 4.31, Seite 65).

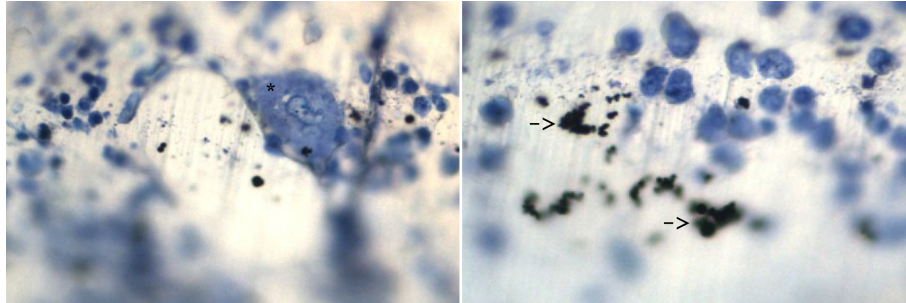


Abbildung 4.29: Unbesiedeltes Scaffold coated vier Wochen postoperativ: Ein Osteoklast mitten im Scaffold (linkes Bild (*)) und Abbauprodukte des Scaffolds (rechtes Bild (Pfeil)), (500x, Toluidinblau)

In denen mit allogenen Stammzellen besiedelten Scaffolds kam es schnell zu Bildung von Knochenmatrix, auch mitten im Implantat (siehe Abbildung 4.30, Seite 65). Dies ging einher mit Abbau des Kalziumphosphatanteils des Scaffolds, was durch die starke Detritusbildung gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 4.29). Bei den unbesiedelten Implantaten fand, wie oben beschrieben, eine Zelleinwanderung von den Implantat-Knochen-Grenzen her statt. Jedoch wurde hier nicht so schnell und viel Knochen gebildet, auch entstanden nicht so viele Abbauprodukte. Ein Unterschied in der Degradationsgeschwindigkeit zwischen den Implantaten coated einerseits und coated and loaded andererseits konnte zu den Zeitpunkten vier und 20 Wochen postoperativ in der Histologie nicht festgestellt werden. Es konnten von außen in das Scaffold migrierende Zellen und einwachsender Knochen nachgewiesen werden. Hierbei bestand kein Unterschied zwischen besiedelten und unbesiedelten Scaffolds (siehe Abbildungen 4.32 und 4.33, Seite 66). Die im fpvCT und μ -CT beobachteten endostalen und periostalen Wachstumsprozesse ließen sich in der Histologie nachvollziehen und deren Herkunft bestätigen. Es fielen wie im μ -CT unterschiedliche Knochenstrukturen auf.

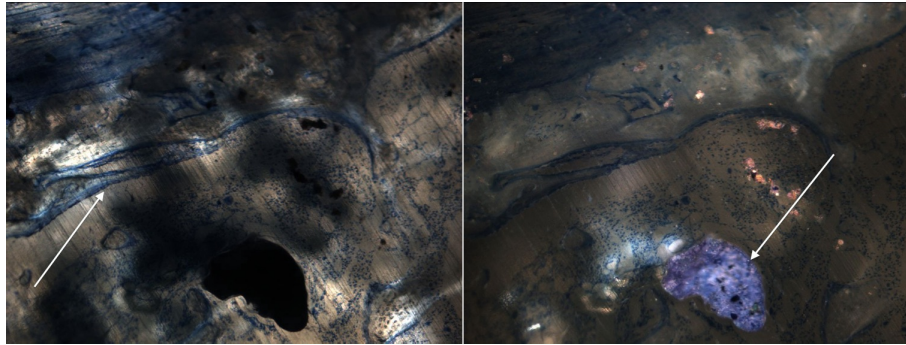


Abbildung 4.30: Mit MSCs besiedletes Scaffold coated and loaded vier Wochen postoperativ: Knochenbildung (rechts im Auflicht erkennbar) und deutlicher Zellsaum auf der Oberfläche des Implantats(s. Pfeile, 100x, Toluidinbalu, links Durchlicht, rechts Auflicht)

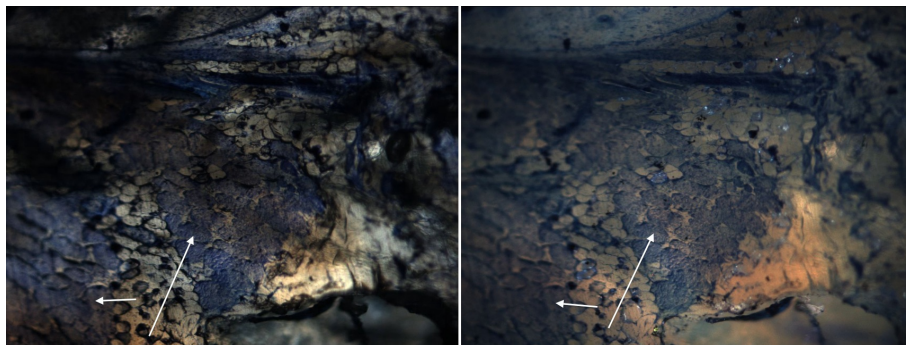


Abbildung 4.31: Mit MSCs besiedeltes Implantat coated and loaded, 20 Wochen postoperativ: In den PLGA-Waben hat sich neuer Knochen gebildet (s. Pfeile, links Durchlicht, rechts Auflicht, 100x, Toluidinblau)

Gefäßbildung

In allen Scaffolds konnte vier Wochen postoperativ Gefäßbildung nachgewiesen werden, neben Gefäßen mitten im Implantat auch in der Bildung befindliche (sogenannte intussuszeptionelle Gefäßbildung) (siehe Abbildungen 4.34 und 4.35, Seite 67). Hier war kein Unterschied zwischen besiedelten und unbesiedelten Implantaten feststellbar. Es trat bei keinem Tier eine Nekrose im Scaffold oder im eingewachsenen Knochen auf.

4.5.3 Zusammenfassung

Mit der histologischen Untersuchung konnte belegt werden, dass Knochen in den Scaffolds entstanden ist und diese nach 20 Wochen bis auf das PLGA Gerüst abge-

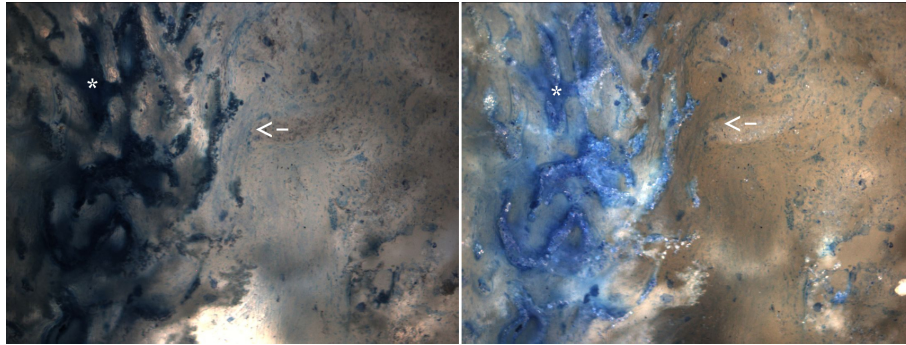


Abbildung 4.32: Unbesiedeltes Implantat coated vier Wochen postoperativ: Vom Endost gebildeter Knochen (im linken Bildabschnitt (*)) wächst Knochen in das Scaffold ein (Pfeile)(links Durchlicht, rechts Auflicht, 100x, Toluidinblau)

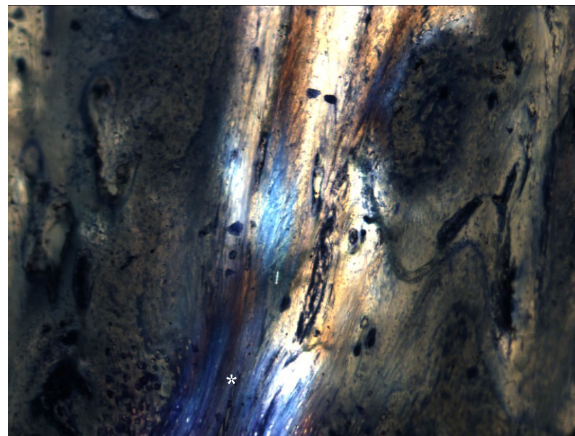


Abbildung 4.33: Mit MSCs besiedeltes Implantat coated and loaded, 20 Wochen postoperativ: Von der Schnittkante aus (hier im linken Bildabschnitt) wächst Knochen (*) in das Scaffold (im rechten Bildabschnitt)(Durchlicht, 100x, Toluidinblau)

baut wurden. Auch wurde gezeigt, dass Zellen und Knochen von außen in die Scaffolds einwandern und es zu Gefäßneubildungen kommt. Bei den besiedelten Scaffolds konnte außerdem die de novo Knochenbildung im gesamten Scaffold nachgewiesen werden.

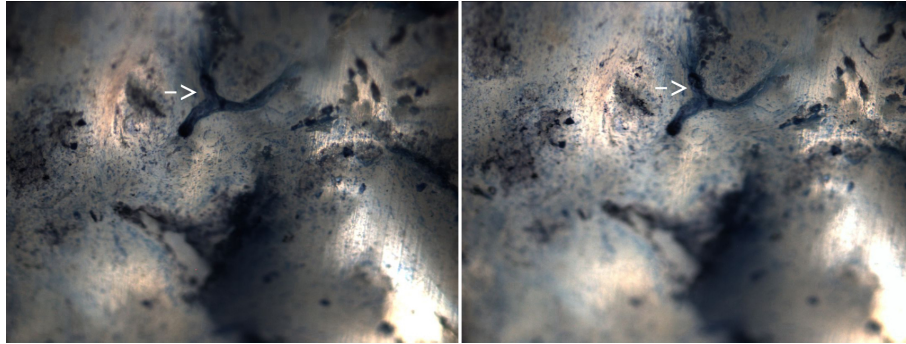


Abbildung 4.34: Unbesiedeltes Implantat coated vier Wochen postoperativ: In der Mitte des Scaffolds ist eine Gefäßgabelung darstellbar (s. Pfeile)(links Durchlicht, rechts Auflicht, 100x, Toluidinblau)

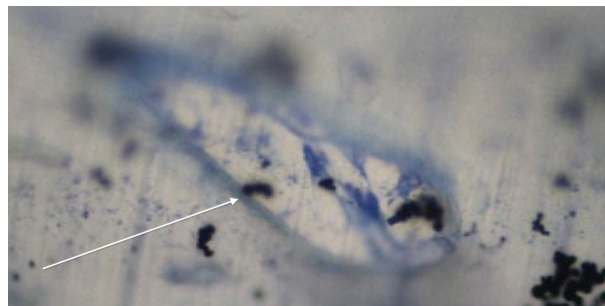


Abbildung 4.35: Unbesiedeltes Implantat coated vier Wochen postoperativ: Intussuszeptionelle Gefäßbildung (s. Pfeil, Durchlicht, 500x, Toluidinblau)

5

Diskussion

5.1 Auswertungsmethoden

5.1.1 Projektionsradiographie

Die Projektionsradiographie ist eine kostengünstige, weit verbreitete Untersuchungsmethode und wird deshalb auch im Bereich des Tissue Engineering von Knochen häufig zur Verlaufskontrolle eingesetzt [20, 61, 83]. Mit ihrer Hilfe kann im Verlauf in vivo die Osteosynthese kontrolliert und der Heilungsprozess dargestellt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass nicht unbedingt eine Anästhesie der Tiere erfolgen muss.

Jedoch unterliegt die Darstellbarkeit des Defekts, des Scaffolds und des Wachstumsprozess Einschränkungen: Neben der sehr begrenzten Auflösung und der damit verbundenen schlechten Beurteilbarkeit von Details ist es vor allem sehr schwer, das räumliche Geschehen einzuschätzen, da eine Aufnahme in zwei Ebenen durch die Platte behindert wird. Durch diese Reduktion eines dreidimensionalen Geschehens auf eine zweidimensionale Ebene und die geringe Auflösung ist eine differenzier-

te Betrachtung des Verlaufs der Heilungsphase praktisch nicht möglich. So kann es zu Fehleinschätzungen kommen, zum Beispiel können extraossäre Prozesse Knochenbildung im Osteotomiespalt vortäuschen und der Schluss der Osteotomie kann fälschlicherweise angenommen werden.

Des weiteren ist die Darstellung des Scaffolds sehr schwierig. In unserem Versuch gelang es mit der Projektionsradiographie nicht, das Implantat sicher zu identifizieren. Dadurch konnte weder der Erfolg der Operation (also das korrekte Einsetzen des Scaffolds in den Osteotomiespalt) noch das Degradations- bzw. Schrumpfungsverhalten des Implantats beurteilt werden. Die Darstellbarkeit des Scaffolds ist natürlich stark von seiner Komposition und dem jeweiligen Röntgengerät abhängig, jedoch muss es zur Verlaufskontrolle möglich sein, auch weniger röntgendichte Scaffolds darzustellen.

Eine weitere Einschränkung ist, dass sich die Aufnahmeergebnisse nicht quantifizieren lassen, also der eingewachsenen Knochen nur qualitativ beurteilt werden kann. Dies stellt, auch durch die fehlende dreidimensionale Darstellung, hohe Anforderungen an den Auswertenden. Manche Autoren versuchen diesen Nachteil mit der Bildung von eigenen Scores zu überwinden, um die Ergebnisse zu objektivieren und quantifizieren [20, 33].

Als schnelles, einfaches und kostengünstiges Verfahren zur orientierenden Kontrolle der Osteosynthese und des Heilungsprozesses in vivo ist die Projektionsradiographie sicherlich momentan ohne Alternative. Sobald aber die genauere Darstellung von Details oder eine dreidimensionale Abbildung des Geschehens erforderlich sind, muss nach Alternativen gesucht werden. Deswegen werden meist andere Auswertungsverfahren zusätzlich eingesetzt [20, 33].

5.1.2 fpvCT

Die flat panel volumetric Computer Tomography ist ein relativ neues Verfahren zur hochauflösenden, dreidimensionalen Darstellung von Geweben in vivo. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass es sehr gut zur Darstellung von Knochendetails und Gefäßen geeignet und herkömmlichen Computertomographen überlegen ist [30, 59, 66, 70, 82]. Das fpvCT erzielt bei vergleichbarer Strahlendosis und Untersuchungsdauer eine wesentlich bessere Ortsauflösung (bei uns $0,2\text{mm}^3$) als

herkömmliche Computertomographen [60]. Durch die Technik der isotropen Voxel, also kubische Voxel, kann jede beliebige Schnittebene ohne Qualitätsverlust dargestellt werden. Dies ist vor allem in der genauen Beurteilung des Knochenwachstums sehr hilfreich. Gegenüber dem μ -CT hat das fpvCT den Vorteil eine viel geringere Strahlendosis zu benötigen und damit mehrmals bei einem Tier in vivo anwendbar zu sein. Auch die Scanzeit ist deutlich kürzer.

Ein entscheidender Punkt ist des weiteren, dass Untersuchungen der Osteosynthese ohne wesentliche Artefaktbildungen durch das Osteosynthesematerial möglich waren. Dies war vorher noch nicht belegt worden. Auch konnte das gesamte Femur dargestellt werden, sonst war dies nur mittels Projektionsradiographie möglich. So konnte die gesamte Osteosynthese über den Versuchszeitraum detailliert beobachtet werden. Aus diesem Bildmaterial ließen sich wichtige Rückschlüsse auf die Methodik des Critical Size Defect und vor allem der Osteosynthese ziehen. Genauso konnte zum ersten Mal das Scaffold in vivo dargestellt und somit bewiesen werden, dass das Implantat postoperativ an der richtigen Stelle saß und es zu keiner rapiden Implantatschrumpfung kam. Es zeigten sich im Zeiterlauf deutliche Veränderungen des Scaffolds im fpvCT: Hier ist vor allem der augenscheinliche „Abbau“, die Verplumpung der Struktur und die Sklerosezonen im Scaffold zu nennen, aber auch der in den Osteotomiespalt einwachsende Knochen..

Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um die Degradation des Scaffolds mit Knochenneubildung im Scaffold handelt. Dies kann jedoch nur vermutet, mittels fpvCT nicht belegt werden. Denn man kann mittels fpvCT nicht zwischen den drei unterschiedlichen Kalziumphosphatphasen, dem neugebildetem Knochen, dem Coating und dem Loading, unterscheiden. Auch ist das PLGA des Scaffolds nicht darstellbar, also kann auch keine Aussage über die Degradation dieses Teils getroffen werden. Es könnte durchaus sein, dass der in den Osteotomiespalt einwachsende Knochen in den verbleibenden PLGA-Teil des Scaffolds einwächst, während der Kalziumphosphatanteil abgebaut wird bzw. schon ist. Es lässt sich also kein qualitative Aussage über Degradation und Knochenneubildung im fpvCT treffen.

Auf die Darstellung von Gefäßen war im Vorfeld der fpvCT-Untersuchungen große Hoffnung gelegt worden. Nach gelungener Darstellung von Neoangiogenese in Tumoren der Maus [30, 47] hofften wir, mittels Kontrastmittel Gefäßneubildungen in und um den Osteotomiespalt in vivo mit dem fpvCT darstellen zu können. Dies

gelang jedoch nicht. Es ließen sich zwar die größeren Femurgefäße darstellen, doch konnten keinen kleinen Gefäße im und um den Knochen oder gar im Osteotomiespalt abgebildet werden. Dies lag wahrscheinlich an dem im Vergleich zu den sehr kleinen Gefäßen zu großen Field of View. Andererseits konnte aber keine zentrale Nekrose nachgewiesen werden. Dies war ein deutlicher Hinweis für eine neu entstandene, intakte Gefäßversorgung im Osteotomiespalt.

Ein weiterer kritischer Punkt war der Tod von vier Kaninchen im Rahmen der Kontrastmittelapplikation. Eine allergische Reaktion war sehr unwahrscheinlich, da die Todesfälle frühestens bei der vierten KM-Untersuchung auftraten. Die Verteilung auf nahezu eine Versuchsgruppe (Scaffold „coated“) legt einen Zusammenhang zwischen Kalziumphosphat und Kontrastmittelreaktion nahe. Interaktionen mit Kalziumphosphat sind für Imeron 300 oder ähnliche Kontrastmittel nicht bekannt. So können zwar hohe intravenöse Konzentrationen von Imeron den Serumspiegel von Kalzium falsch hoch erscheinen lassen, jedoch ohne bekannte Wirkung auf den Gesamtorganismus. Auch die Häufung in der Gruppe „coated“ spricht gegen einen Zusammenhang, da in der Gruppe „coated and loaded“ eine wesentlich höhere Kalziumphosphat-Konzentration vorhanden ist.

Anzeichen für ein akutes oder chronisches Nierenversagen, ob kontrastmitteliniziert oder nicht, bestanden klinisch auch nicht. Entsprechende Laborparameter wurden jedoch nicht überprüft.

Wir nehmen an, dass die durch den Transport- und Untersuchungsstress (Einleitung der Anästhesie) ohnehin schon vorbelasteten Kaninchen, bei Applikation des Kontrastmittels einen Kreislaufschock erlitten. Kaninchen sind sehr stressanfällige Tiere und so sind Ortswechsel und unbekannte Umgebungen besonders gefährlich für die Tiere. Eine Eingewöhnungsphase von ein bis zwei Stunden in einem ruhigen und klimatisiertem Raum vor der Untersuchung senkt die Stressbelastung und damit das Herz-Kreislauf-Risiko deutlich.

Neben den großen Vorteilen bei der Darstellung von Knochen ist ein Nachteil sicherlich die Seltenheit des fpvCTs. Auf Grund der geringen Verbreitung der Methode müssten meist lange Anfahrtswege in Kauf genommen werden oder - besser - der gesamte Versuch am Standort des fpvCTs angesiedelt werden, um den Tieren lange Transporte zu ersparen. Ein weiterer Nachteil im Vergleich zur Projektionsradiographie sind die deutlich höheren Kosten pro Untersuchung, andererseits lassen

sich wesentlich genauere Aussagen über den Heilungsverlauf treffen. Als einzige Auswertungsmethode ist aber auch das fpvCT nicht ausreichend, da zwar das Scaffold dargestellt werden kann, aber keine konkrete Aussage über Knochen- und Gefäßneubildung im Scaffold und im Osteotomiespalt getroffen werden kann. Leider gibt es auch noch kein Programm zur Quantifizierung des Knocheneinwuchses in den Osteotomiespalt, welches eine Objektivierbarkeit der Ergebnisse ermöglichen würde. So bleibt momentan nur die qualitative Analyse. Diese ist aber ein sehr wertvolles Instrument, um Prozesse im Knochen und Osteotomiespalt im Verlauf der Zeit zu beobachten und kann damit wichtige Daten zu Versuchsaufbau und Methodik geben.

5.1.3 μ -CT

Das μ -CT ist mittlerweile eine etablierte Methode zur Evaluation von Tissue Engineering von Knochen [33, 42]. Es hat eine sehr hohe Auflösung (bei uns eine minimale Pixelgröße $2\mu\text{m}$) und kann so selbst kleinste Details darstellen. Allerdings ist die Strahlendosis deutlich höher als beim fpvCT, die Untersuchungszeit länger und die zu untersuchende Probe darf eine bestimmte Größe nicht überschreiten (in unserem Falle 2cm). Des weiteren musste vor dem Scan alles Osteosynthesematerial entfernt werden, da es sonst zu starker Artefaktbildung kam. Diese Punkte machen eine in vivo Untersuchung unmöglich. Selbst bei der postmortalen Bildgewinnung machte die Entfernung von Platte und Schrauben und das Größenlimit ein radikales Beschneiden des Femurs nötig. So konnte in unserem Fall nur der Bereich um den Osteotomiespalt dargestellt werden.

Dieser Bereich lässt sich jedoch sehr gut beurteilen. Durch die gute Darstellung des Knochens konnten die Ergebnisse aus dem fpvCT bestätigt und die vorher in der Projektionsradiographie untersuchten unbesiedelten Scaffolds genauer beurteilt werden. Natürlich ließen sich keine genauen Aussagen über den zeitlichen Verlauf und das gesamte Femur treffen. Auf Grund der höheren Auflösung (im Vergleich zum Röntgen und fpvCT) konnte auch zum ersten Mal das Scaffold im Detail betrachtet werden. Auch hier konnte keine Differenzierung zwischen Knochen im und Kalziumphosphatphase des Scaffolds getroffen werden, jedoch wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen in der Kalzifizierung des Scaffolds deutlich, ein starker Hinweis auf Knochenbildung im Scaffold. Eine Darstellung von Gefäßen gelang nicht, jedoch konnte auch hier keine zentrale Nekrose nachgewiesen

werden.

Vor allem bei der Darstellung der Scaffolds hat das μ -CT wichtige neue Erkenntnisse gebracht. Jedoch kann es die beiden verbliebenen wichtigen Fragen - Gefäßneubildung und Unterscheidung von Knochen und Kalziumphosphatphase des Scaffolds - auch nicht eindeutig beantworten. Ein großes Problem ist außerdem die notwendige Beschneidung der Proben, dadurch gehen wichtige Informationen für die Histologie verloren.

5.1.4 Histologie

Seitdem die histologische Aufbereitung von unentkalktem Knochen technisch möglich ist, ist die Histologie ein Standardverfahren in der qualitativen Auswertung von Defektmodellen. Nur mit ihr können verschiedene Gewebe und Strukturen sicher identifiziert und differenziert werden. So war es in unserem Fall erst mit der Histologie möglich, zu beweisen, dass im Osteotomiespalt neue Gefäße entstanden, im Scaffold Knochen gebildet und das Implantat bis auf das PLGA-Gerüst abgebaut wurde. Auch wurde klar, dass unterschiedliche Arten von Knochen entstehen.

Für diese Erkenntnisse muss die Probe aber eingebettet und zerstört werden und danach sind kaum noch andere Untersuchungen an ihr möglich. Durch die Trenn-Dünnschliff-Methode [14] geht ein erheblicher Anteil der Probe einfach verloren (Abschliff), des weiteren ist diese Methode zeitaufwändig und technisch sehr anspruchsvoll. Eine Alternative wäre die Schnitt-Technik, diese ist aber bei sehr hartem Material wie Knochen mit hohen Verlustquoten und Artefakten behaftet. So ist es nicht möglich, den gesamten Knochen histologisch auszuwerten und eine quantitative Aussage über Knocheneinwuchs zu erhalten. Für einzelne Schnitte ist dies zum Beispiel mit der Histomorphometrie möglich, aber eine gesamte Probe lässt sich kaum darstellen, so bleibt immer nur der zweidimensionale Eindruck.

Wie oben beschrieben, ist die Histologie aber sehr nützlich um gezielt Befunde aus anderen Untersuchungen zu überprüfen und zu belegen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Schnitte archiviert und jederzeit neu begutachtet werden können.

5.1.5 Zusammenfassung

Die Wahl der richtigen Auswertungsmethode bei in vivo Versuchen zu Tissue Engineering von Knochen hängt von den Fragestellungen ab. Man kann grundsätzlich zwei Gruppen unterscheiden: Auswertungsmethoden, die in vivo untersuchen auf der einen und Methoden die ex vivo und damit meistens post mortal untersuchen. Projektionsradiographie und fpvCT als in vivo Untersuchungsmethoden unterscheiden sich in zwei entscheidenden Punkten: Das fpvCT hat eine deutlich höhere Auflösung und es lässt sich jeder Punkt im Volumen darstellen, also Dreidimensionalität. Dies bringt viele Vorteile mit sich, wenn gleichzeitig zum Beispiel die Methodik evaluiert werden soll. So lassen sich Osteosynthese und Heilungsprozess detailliert beobachten. Wenn jedoch Tiermodell und Osteosynthese etabliert sind und nur eine postmortale Untersuchung mittels Histologie oder μ -CT stattfinden soll, so ist die Projektionsradiographie als Verlaufskontrolle die einfachere und günstigere Methode.

Jedoch ist das fpvCT mehr als nur eine Alternative zur projektionsradiographischen Verlaufsbeobachtung. Es kann auch das μ -CT ersetzen. Das fpvCT bringt gegenüber dem μ -CT einige entscheidende Vorteile mit sich: Die Proben können unversehrt und sogar in vivo belassen werden, die Strahlenbelastung ist deutlich geringer und die Scans viel kürzer. So können am selben Tier mehrere Scans zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen werden und der zu untersuchende Bereich bleibt bis zur histologischen Aufarbeitung unversehrt. Dadurch wäre es möglich, die Versuchstieranzahl zu reduzieren. Natürlich ist die Auflösung nicht so hoch wie im μ -CT, jedoch ist für manche Fragestellungen eine solch hohe Auflösung nicht unbedingt notwendig. Vor allem, wenn noch eine histologische Aufarbeitung angeschlossen wird. Damit ein praktikables Konzept ohne μ -CT realisiert werden kann, muss die Darstellbarkeit des Scaffolds allerdings noch verbessert werden. Dies könnte durch eine Reduktion des Untersuchten Volumens erreicht werden. So kann zum Beispiel in einem Scan der gesamte Femur, im zweiten dann nur der Osteotomiespalt untersucht werden, um hier eine höhere Ortsauflösung zu erzielen und das Scaffold detaillierter darzustellen. Das fpvCT und μ -CT haben gemein, dass keine Differenzierung zwischen den Kalziumphosphatphasen von (neugebildetem) Knochen und Scaffold möglich ist.

Die Histologie und das μ -CT als postmortale Methoden haben beide den Nach-

teil, den Tod des Versuchstieres und die zumindest teilweise Zerstörung der Probe vorauszusetzen. Andererseits können bis jetzt nur mit der Histologie Gefäße und Knochen im Scaffold nachgewiesen und damit entscheidende Befunde erhoben werden. Das μ -CT hat vor allem in der Darstellung des Scaffolds einen großen Vorteil gegenüber dem fpvCT (siehe oben).

Wie oben beschrieben hat jedes Verfahren Vor- und Nachteile. Ein Verfahren alleine kann nicht genug Aussagen treffen um Erfolg oder Misserfolg eines Versuches zu beurteilen. In Kombination sind diese Untersuchungsmethoden aber sehr gut geeignet um eine detaillierte Evaluation von in vivo Versuchen zum Tissue Engineering von Knochen durchzuführen. Es zeigte sich außerdem, dass das fpvCT eine wichtige Ergänzung zu den etablierten Methoden ist und entscheidende Erkenntnisse beitragen kann.

Wenn man an die klinische Anwendung beim Menschen denkt, so kommt der Projektionsradiographie und dem fpvCT sicherlich die größte Bedeutung zu. Um den Operationserfolg und Heilungsprozess beim Menschen nach Scaffoldimplantation zu überwachen, werden sicherlich die Verfahren wie das fpvCT, also hochauflösende dreidimensionale Darstellungen, an Bedeutung gewinnen. Da diese, jedenfalls im Falle des CTs, aber auch mit einer hohen Strahlendosis einhergehen, werden sicherlich Alternativen benötigt werden um die Strahlenbelastung zu vermindern. Diese könnten im Bereich der Magnetresonanztomographie liegen, wenn es um nicht metallische Implantate geht.

5.2 Versuchsaufbau

5.2.1 Tiermodell

Um ein Scaffold in vivo zu testen, muss ein geeignetes Tiermodell verwendet werden. Zur initialen in vivo Testung von neuen Materialien hat sich das Kaninchenmodell auf Grund geringer Kosten, einfachem Handling und Gemeinsamkeiten in der Knochenbiologie mit dem Menschen bewährt. Trotz großer Unterschiede im mikrostrukturellen Aufbau des Knochens, gibt es einige Gemeinsamkeiten in der Zusammensetzung des Knochens [54, 81]. Vor allem ist aber Knochenwachstum und Remodeling des Kaninchens mit dem des Menschen vergleichbar, so kommt es zum

Beispiel zur Entwicklung von Haversschen Kanälen in der Kortikalis [24]. Dies konnte auch in unseren histologischen Untersuchungen bestätigt werden. Bei der Bewertung von Ergebnissen sollte jedoch bedacht werden, dass Kaninchen eine deutlich höhere Knochenumsatzrate haben als Menschen und andere Tiere (manche Nagetiere, Primaten) [8, 26, 57].

Zur Testung von Implantatmaterialien ist der Defekt kritischer Größe (Critical Size Defect) ein Standardmodell. Wichtig ist jedoch zu beachten, dass die Länge des Defekts stark von Tierart, anatomischer Lokalisation, Alter und effektiver Entfernung des Periosts abhängt [35, 36, 56, 72]. Auf Grund dieser vielen Variablen müssen bei Versuchen mit Critical Size Defect immer Leerdefekte zur Kontrolle des Modells mituntersucht werden. Die nötige Länge für einen Defekt Kritischer Größe im Femur des Kaninchens ist von Fialkov et. al. für 12mm angegeben worden [20]. Bei unseren Leerdefekten zeigte sich nach acht Wochen deutliche Knochenformation und Knochenspangebildung, nach 20 Wochen schien projektionsradiographisch ein Defekt sogar geschlossen. Nach der Definition von Hollinger und Kleinschmidt [35, 72] muss man die Frage stellen, ob diese Defektlänge für einen CSD ausreichend war.

Da es jedoch bei beiden Leerdefekten vor allem zu Knochenbildung außerhalb des Spaltes von den Austrittsstellen der Schrauben und vom Periost ausgehend gekommen ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Knochenbildung auf drei andere Faktoren zurückzuführen ist und damit nicht auf einen zu kurzen Defekt kritischer Größe: Erstens das nicht vollständige Entfernen des Periosts und damit osteogener Zellen um den Osteotomiespalt, zweitens versprengte Kortikalisstücke und -Spangen von den Austrittsstellen und damit eine Quelle für extraossäre Knochenbildung und drittens biomechanische Faktoren, wie sie weiter unten diskutiert werden (siehe Abschnitt 5.3, Seite ??). Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Periostenfernung um den Defekt und einer sauberen Operation und Osteosynthese.

Ein Nachteil der Kaninchen ist ihr Verhalten. Sie sind sehr schreckhafte Tiere und somit sehr empfindlich gegenüber ungewohnten Geräuschen, Umgebungswechseln und Transporten. Ein großes Problem kann das als Schreckreflex ausgelöste „Schlagen“ mit den Hinterläufen sein. Diese Bewegung, eigentlich als Start der Flucht eingesetzt, erzeugt extrem hohe Belastungen auf der hinteren Extremität und somit auch auf dem operierten Femur. Dies kann im Extremfall zu Osteosyntheseversa-

gen beitragen. Ein anderes Problem sind die in den Angst-, also Stresssituationen auftretenden hohen Belastungen des Herz-Kreislauf-Systems. Diese können, wie in unserem Fall beim fpvCT, zum Tod des Tieres durch Herz-Kreislauf-Versagen führen. Zur Vermeidung dieser Komplikationen können einige einfache Maßnahmen ergriffen werden: An erster Stelle steht hier die Gewöhnung der Tiere an menschlichen Umgang und Geräusche: Fillman-Holliday und Landy [21] beschreiben, dass regelmäßiger menschlicher Kontakt die Tiere an diesen gewöhnt und damit stressreduzierend wirkt und dass leise Musik für einen gewissen Zeitraum pro Tag die Geräuschempfindlichkeit und Heftigkeit der Reaktion auf unerwartete Geräusche von Kaninchen reduziert. Aus unserer Erfahrung lässt sich berichten, dass ein- bis zweistündige Eingewöhnungszeiten in ruhigen Räumen nach Transporten (zum Beispiel zum Röntgen oder fpvCT) die sichtbaren Stressreaktionen (Fluchtversuche, Tachykardien, Herz-Kreislauf-Versagen) deutlich reduzierten.

Ein weiterer kritischer Punkt in der Tierhaltung war die Futterversorgung. In Übereinstimmung mit Studien von Holy et. al. und Fialkov et. al. [20, 36] wurden die Kaninchen mit Futter und Wasser ad libitum versorgt. Durch diese unkontrollierte Nahrungsaufnahme und den Mangel an Bewegung in den Käfigen kam es im Verlauf der Versuchszeit zu massiver Gewichtszunahme bei den Tieren. Nach 16 Wochen wogen die Tiere über fünf Kilogramm. Dies ging natürlich auch mit einer erhöhten Belastung der Osteosynthese einher. Dies und die Vermeidung von anderen mit Übergewicht assoziierten Erkrankungen bei Kaninchen sollte eine Diät ad libitum in Frage stellen [21].

5.3 Operation und Osteosynthese

In einem Defektmodell wie diesem muss der Defekt mit einer Osteosynthese versorgt werden. Diese sollte eine möglichst stabile Umgebung zur Knochenheilung schaffen. Da das hier eingesetzte Scaffold nur eine sehr begrenzte mechanische Stabilität besitzt, muss die Osteosynthese auch fast die gesamte Kraftübertragung übernehmen (load bearing) [1]. Obwohl die Bedeutung der Osteosynthese im Tissue Engineering von Knochen unumstritten ist, ist die optimale Versorgung bei Knochenersatzbehandlung nicht bekannt. Des weiteren ist völlig unklar, wie sehr die Osteosynthese das Scaffold von Belastung abschirmen sollte, um ein ideales Ergebnis zu erzielen

[1]. Sicherlich ist dies auch sehr stark vom verwendeten Scaffold abhängig.

5.3.1 Osteosyntheseversagen

In Versuchen anderer Arbeitsgruppen war es im selben Versuchsmodell schon zu Osteosyntheseversagen gekommen. Bei Holy et. al. [36] war es zum Plattenverbiegungen gekommen. Um dieses in Zukunft zu verhindern, wurde die Platte gewechselt und die Applikationsart geändert: Eine stärkere, 2,7mm dicke Mandibularplatte aus der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie wurde eingesetzt und anstatt einer Acht-Loch-Platte wurde eine Sieben-Loch-Platte benutzt. Statt zwei wurde über der Osteotomie nur noch ein Schraubenloch frei gelassen, auf beiden Seiten wurde die Platte mit jeweils drei Schrauben befestigt. Dieses Modell wurde unter anderem später auch von Fialkov et. al. mit Erfolg angewandt [20] und deswegen von uns übernommen.

Ungeblockte Schrauben und Umstellung auf winkelstabile Osteosynthese

In den Vorversuchen kam es dann zu der oben beschriebenen sehr hohen Anzahl von Osteosyntheseversagen durch Schraubenausriss aus einem Femursegment. Dies ließ sich biomechanisch und auf Grund der Knochenmorphologie der Kaninchen erklären. In einem Schrauben-Platten-Knochen Konstrukt, in dem wie bei uns die Schrauben nicht fest mit der Platte verbunden sind (= nicht winkelstabil) ist die Stabilität des Konstruktes vom Drehmoment der eingebrachten Schrauben und dem Reibungskoeffizienten zwischen Platte und Knochen abhängig. Diese beiden Größen addieren sich zu der Reibungskraft. Die Belastung der Schrauben verteilt sich aber nicht gleichmäßig, sondern dem Drehmoment der Schrauben proportional. Das heißt, die Schrauben mit dem höchsten Drehmoment werden den höchsten Belastungen ausgesetzt [1, 16, 23, 62].

Wenn diese Reibungskraft (also Drehmoment der Schrauben plus Reibungskoeffizient von Platte und Knochen) aber überschritten wird, hängt die Stabilität der Osteosynthese nur noch von der axialen Stabilität der Schrauben am weitesten vom Frakturspalt entfernt ab [16]. Da die Platte der Schraube mangels Befestigung aber keine axiale Stabilität geben kann, wird diese durch den Kortex direkt unter der Platte gewährt und dieser wird durch hohe Scherkräfte belastet. Die Verbindungsfläche von Knochen und Schrauben ist der kritische, stabilitätsbestimmende Punkt.

Also hängt die Stabilität hier auch sehr von der Knochenqualität ab. Kann der Knochen den Scherkräften nicht mehr standhalten, rotiert die Schraube in der Kortikalis um den Verankerungspunkt in der Gegenkortikalis. Die Schrauben lockern sich und es kann zum Schraubenausriss kommen [1, 16, 23, 62].

Platten mit ungeblockten Schrauben wurden ursprünglich entwickelt, um in offener Reposition eine Kompression der Frakturteile zu erreichen und damit eine direkte, also Kontaktosteogenese zu ermöglichen. In diesem Aufbau dient die Platte als Stabilisator bei Torsions- und Rotationsbewegungen. Sie muss jedoch nicht die gesamte axiale Last übertragen, da sie sich diese Aufgabe mit dem Knochen „teilt“ (load sharing). Dadurch ist die axiale Belastung der Platten und Schrauben deutlich geringer und die Reibungskraft des Konstruktes wird nicht so leicht überschritten. In unserem Versuchsaufbau musste aber die Osteosynthese die gesamte axiale Kraftübertragung bewältigen. Durch die Bewegung der Kaninchen kam es zu hohen Belastungen und die Schrauben rissen aus, sehr wahrscheinlich auf Grund oben beschriebenen Mechanismus. So gab es zwei Punkte die man verbessern konnte: Die Kraftübertragung an den Schrauben und die Knochenqualität.

Sind die Schrauben stabil mit der Platte Verbunden, entsteht ein eingliedriges Osteosynthesystem (single beam). Durch den stabilen Winkel zwischen Platte und Schrauben wird die Scherbelastung in Kompressionsbelastung des Knochens an der Schrauben-Knochen-Grenzfläche umgewandelt. Dies ist eine Verbesserung, da Knochen eine wesentlich höhere Toleranz gegenüber Kompressions- als Scherkräften besitzt [16, 49, 76]. Außerdem ist die Befestigungskraft in winkelstabilen Systemen eine Summe aus allen Schrauben-Knochen-Grenzflächen, wohingegen bei ungeblockten Schrauben die Kraft von der axialen Belastbarkeit der einzelnen Schraube abhängt (siehe oben)[16]. Die Stabilität der Osteosynthese ist hier von der Länge der Schrauben, deren Durchmesser, dem Abstand und den Beschaffenheiten der Platte abhängig [16, 49, 76].

Es gibt mittlerweile viele Untersuchungen zur optimalen Verwendung des winkelstabilen Systems. Unter anderem werden die Einflüsse von Schraubenanzahl, -Quotient und -Plazierung und Plattenlänge auf die Stabilität bei axialen, Biegungs- und Torsionsbelastungen untersucht. Fulkerson et. al. konnten zeigen, dass ein winkelstabiles System mit bikortikalen Schrauben anderen Plattensystemen in der Versorgung eines segmentalen Diaphysären Defekts überlegen war [22].

Auf dem Boden dieser Studien entschieden wir uns für ein winkelstabiles System. Es wurden bikortikale Schrauben zum Ausgleich der hohen Torsionskräfte eingesetzt [49]. Des weiteren wurde der kleinstmögliche Schraubenfreie Raum über der Osteotomie zur Reduzierung des Biegemoments an der Platte ausgewählt [75]. Da Chinchilla Bastard Kaninchen eine härtere Knochenqualität haben sollen als New Zealand White Rabbits, wurden für den Versuch nur Chinchilla Bastard Kaninchen eingesetzt.

Winkelstabile Osteosynthese

Trotz der Umstellung kam es auch beim winkelstabilen System zu Osteosyntheseversagen durch Schraubenausriss, jedoch deutlich seltener. Da die Osteosyntheseverfahren auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen, war es wahrscheinlich, dass es hier andere Gründe für das Osteosyntheseversagen gab. Zur Klärung der Ursache konnte das fpvCT mit seiner hochauflösenden in vivo Darstellung des Operationsgebietes entscheidend beitragen. Wie oben schon beschrieben, traten bei vielen Tieren Risse von den Schraubenein- und Austrittsstellen auf. Diese zogen meist von den Schrauben drei und vier in den Osteotomiespalt. Wenn diese jedoch den gesamten Femurteil entlangzogen, also die Ein- und Austrittslöcher untereinander verbanden, folgte der Ausriss der Schrauben des betroffenen Abschnitts.

Durch die Risse im gesamten Femurteil hatte keine Schraube mehr Halt in der Kortikalis. Vor allem den in Kompressionskräfte umgewandelten axialen Belastungen konnte nicht mehr begegnet werden und die Schraubenlöcher und Risse wurden erweitert. Durch die verminderte Fixierung der Schrauben in beiden Kortikalia erfolgte auch eine hohe Belastung des Segments bei Torsionsbewegungen. So erweiterten sich die Schraubenlöcher immer mehr bis schließlich die Schrauben ausrissen.

Eine wichtige Frage ist, wie die kortikalen Risse von den Schraubenlöchern ausgehend entstanden. Auf Grund der radiologischen Untersuchungen (fpvCT) können wir sicher sein, dass diese intraoperativ entstanden. Wir gehen davon aus, dass diese Risse - genauso wie die Knochenabsplitterungen vom Schraubenaustrittsloch - durch einen im Vergleich zur Schraube im Durchmesser zu kleinen Bohrkanal zu Stande kamen. Obwohl die Schrauben ein selbstschneidendes Gewinde hatten, kam es beim Einbringen wohl zu hohen Spannungen im Knochen, die sich dann beim Aussägen der Osteotomie meist in den Osteotomiespalt entluden. Diese Möglichkeit

der Spannungsentladung ist wohl auch der Grund, warum die meisten Risse von den Schrauben drei und vier in den Osteotomiespalt zogen. Im ungünstigsten Fall entstanden Risse über den gesamten Femurteil und es kam zum Schraubenausriss.

Osteosynthese und Implantat

Die oben diskutierten Beobachtung lassen einen Zusammenhang zwischen der Art des Implantats und dem Versagen der Osteosynthese, wie von Tabelle 4.2 suggeriert (siehe Tabelle 4.2, Seite 43) sehr unwahrscheinlich erscheinen. Hier ist durch die niedrige Versuchstieranzahl zufällig ein Schwerpunkt auf eine Gruppe entstanden. Diese Beobachtung konnte auch durch die Vorversuche nicht bestätigt werden.

5.3.2 Einfluss der Osteosynthese auf die Knochenheilung

Es entwickelte sich nicht nur neuer Knochen in Osteotomiespalt und Scaffold, sondern auch außerhalb des Osteotomiespalt, an den Schrauben und der Platte. So kam es zu Spangenbildung über den Osteotomiespalt, zu Knochenwachstum um die Platte und die Ein- und Austrittsstellen der Schrauben, vor allem im Bereich des Osteotomiespalt. Hier fiel der besonders starke Knochenumbau und die Bildung eines Mehrschalenkörpers auf. Des weiteren war bei wenigen Tieren auch der Abbau von Knochen, meist unter der Platte zu beobachten.

Remodelling

Im Bereich der Femuranastomosen, Schrauben und Platten wurde schon bestehender Knochen umgebaut. Diese Prozesse werden mit dem Begriff Remodelling beschrieben. Remodelling von Knochen erfolgt auf Grund von mechanischer Stimulation. Nach dem Wolffschen Gesetz führt mechanische Stimulation zu Knochenanbau und ihr Fehlen zu Knochenresorption. Eine zu hohe Belastung führt aber auch zu Abbau von Knochen. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht geklärt, jedoch scheint mechanische Stimulation zu einer Veränderung der anabolischen Aktivität der Osteozyten zu führen und Osteoblasten über Änderung des perizellulären hydrostatischen Druckes zu beeinflussen. Natürlich können radiologisch sichtbare Veränderung wie Lysen oder Sklerosen auch auf Infektionen oder Tumoren zurückzuführen sein, doch gab es weder klinisch, noch auf Grund des μ -CTs und der Histologie Anhaltspunkte

für solche Prozesse.

Diesem Konzept folgend zeigt vor allem der Umbau des Knochens direkt um den Osteotomiespalt mit Bildung eines mehrschaligen Körpers (also eines Körpers höherer Festigkeit) und knöchernen Einbaus der gesamten Schraube eine hohe mechanische Belastung an. Diese Beobachtung stimmt mit der von Stoffel et. al. überein, die in der Finite Elemente Analyse von winkelstabilen Plattensystemen zeigen konnten, dass die höchste Belastung auf den Schrauben nahe des Frakturspalts liegt. Vor allem dann, wenn wie in unserem Fall die Osteosynthese alleiniger Kraftüberträger ist (load bearing) [75]. Die Bildung eines mehrschaligen Körpers im Röhrenknochen, also einer mehrschichtigen Röhre bedeutet, dass der Knochen hohen Biegebeanspruchungen ausgesetzt ist. Huiskes et. al. konnten übereinstimmend zeigen, dass sich trabekulärer Knochen entlang der Belastungslinien bildet [37].

Der Knochenanbau an den Schraubenein- und Austrittsstellen wird durch die Kompressionskräfte die durch die Schrauben auf den Knochen wirken aus biomechanischer Sicht erklärt. Eine andere Ursache vor allem für den Einbau der aus der Gegenkortikalis austretenden Schraubenspitzen wird das Abheben von Periost und Absprengen von Kortikalis durch die Schraube gewesen sein. So wurden osteogene Zellen freigesetzt und es bildete sich Knochen extraossär um die Schraubenspitze.

Extraossäre Knochenbildung

Im Falle der Spangenbildung außerhalb des Osteotomiespalt und der Knochenbildung um und zwischen Platte und Knochen handelt es sich um extraossäre Knochenneubildung. Wir meinen, dass diese unter anderem auch durch mechanische Reize stimuliert werden musste. Dies wiederum würde zeigen, dass die Osteosynthese unter hoher Belastung gestanden und sich bewegt haben muss, also die Knochenbildung als Stabilisierungsmaßnahme zu interpretieren ist.

Wenn die Platte nicht direkt dem Knochen anlag, wie es bei fünf Tieren am distalen Femursegment im fpvCT beobachtet werden konnte, fand im Verlauf des Versuchs immer eine Knochenbildung zwischen der Platte und dem Knochen statt. Dies ist biomechanisch gesehen sinnvoll, da mit steigendem Abstand zwischen Platte und Knochen die Rigidität der Fixierung abnimmt [75]. Also ist das Ausfüllen des Raumes mit Knochen eine stabilisierende Maßnahme, induziert durch die erhöhte Beweglichkeit der Schrauben und durch die Schraubenkanäle ausgetretene osteogene

Zellen.

Durch die zahlreichen Haarrisse und Knochenabsplitterungen an den Schraubenein- und Austrittsstellen ließe sich eine minimale Beweglichkeit der Platte, vor allem bei axialen Belastungen erklären. Diese könnte die Knochenbildung um die Platte stimuliert haben.

Sehr interessant ist die Knochenspangenbildung über den Osteotomiespalt. Diese Beobachtung wirft die Fragen auf, wo der Knochen entspringt, wie er entsteht, wieso der Knochen vor allem von distal nach proximal wächst und woran sich das Wachstum orientiert.

Die schon oben beschriebenen Absprengungen der Kortikalis und vor allem die Abhebung des Periosts an den Schraubenaustrittsstellen sind sicherlich Ausgangspunkt für diesen Wachstumsprozess. Diese sind distal am ausgeprägtesten, was die Entstehung der Spangen distal des Osteotomiespalt erklären kann. Es ist sehr wahrscheinlich, dass durch die Biegung der Platte unter Belastung die beiden Femurteile gegeneinander bewegt werden. Diese Bewegungen können die Stimuli für die Proliferation der Spange nach proximal seien, zur Abstützung der Gegenkortikalis und Minimierung der Bewegung der Femurteile gegeneinander. Als Leitschiene dient sicherlich das Scaffold mit seiner osteokonduktiven Oberfläche, wie fpvCT-Aufnahmen und μ -CT deutlich zeigen. So kann die Knochenspange, wenn sie die gegenüberliegende Anastomose erreicht, zur Stabilisierung der Osteosynthese beitragen.

Rigidität der Osteosynthese

Weder im Osteotomiespalt noch bei den außen verlaufenden Knochenspangen kam es zum knöchernen Zusammenschluss der proximalen und distalen Anastomose. Dies war vor allem deswegen überraschend, da in manchen Fällen die beiden Knochen Teile nur Millimeterbruchteile voneinander entfernt waren, sich praktisch aufeinander abstützten.

Diese Phänomene ließen sich mit einer erhöhten Beweglichkeit der Femursegmente untereinander durch Biegebewegungen und Torsionsbewegungen der Platte über dem Osteotomiespalt unter Belastung erklären. Perren beschrieb 1979 seine Theorie des „Fracture Gap Strain“ (Frakturspaltdehnung) [62]. Diese beruht auf der Beobachtung, dass ein Gewebe nicht heilen kann, wenn die Längenänderung des Frakturspalt die der Dehnung des Gewebes zum Zeitpunkt der Ruptur über-

steigt. Für Knochen liegt dieser Wert bei 2%. Neuere Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass wesentlich höhere Belastungen ausgehalten werden können und differenzieren zwischen frühem und späterem Heilungsverlauf [41]. Zu Beginn des Heilungsprozesses sind begrenzte Bewegungen im Frakturspalt der Heilung sogar förderlich und stimulieren die Kallusbildung. Jedoch stört dasselbe Ausmaß an Bewegung im späteren Verlauf die Knochenheilung, das heißt die Heilung wird mit der Zeit empfindlicher gegenüber Bewegungen [28]. Neben diesen Bewegungs- und Belastungsbedingungen ist die Größe des Frakturspalt eine weitere Variable, die den Heilungsprozess entscheidend beeinflusst [29].

In dieses Konzept passt, dass es in den ersten Wochen postoperativ zu starkem Knochenwachstum - auch außerhalb des Osteotomiespalt - kommt. Man könnte die Knochenspangenbildung und Knochenbildung um die Platte als eine Form von durch Bewegung stimulierter Kallusbildung betrachten, da durch diese Proliferationen augenscheinlich eine Stabilisierung erreicht werden soll. Bei einer normalen, sprich kleineren Fraktur, würde der Kallus die nötige Stabilität zum knöchernen Durchbau herstellen. Dies kann hier auf Grund der Größe des Defekts jedoch nicht erreicht werden. Die interfragmentäre Bewegung bleibt zu hoch und es erfolgt - trotz maximaler Annäherung der Segmente - kein knöcherner Schluss der Osteotomie. Dieser Prozess ist auch in den Leerdefekten zu beobachten, also von den Scaffolds unabhängig. Hier handelt es sich also um ein rein mechanisches Problem.

Wenn das Scaffold jedoch knöchern integriert würde, käme es schnell zu einer Stabilisierung der Osteotomie und damit vielleicht zum Schluss. Wir konnten histologisch zeigen, dass es schon vier Wochen postoperativ zu Knochenbildung im Scaffold und zu einer Migration von osteogenen Zellen in das Scaffold kommt, also eine Verbindung zwischen Fremd- und Eigengewebe entsteht. Trotzdem zeigt sich in den späten fpvCTs und noch deutlicher in den postmortalen μ -CTs nach 20 Wochen, dass die Scaffolds oft isoliert vom Restknochen liegen. Dies könnte daran liegen, dass die Scaffolds als Bewegungslager gedient haben, um das sich die Anastomosen bewegt haben. Dies könnte die knöchernen Brücken zwischen Scaffolds und körpereigenen Knochen zerstört und damit - jedenfalls aus biomechanischer Sicht - die Integration verhindert haben. Dadurch konnte das Scaffold auch keine stabilisierende Funktion im Heilungsprozess übernehmen.

Osteolysen

Bei insgesamt fünf Tieren konnten mit dem fpvCT Osteolysen nachgewiesen werden. In drei Fällen zeigten sich Osteolysen in der Kortikalis um den Osteotomiespalt und in zwei Fällen unter der Osteosyntheseplatte in den Femursegmenten. Dies mit Stress Shielding zu begründen ist auf Grund der anderen Befunde, die auf Beweglichkeit der Osteosynthese und damit auf eine mechanische Stimulation des Knochens hindeuten, schwierig. Es scheint eher, dass vor allem die Osteolysen in der Kortikalis um den Osteotomiespalt auf die starken Umbauprozesse des Knochens zurückzuführen sind. Ein weiterer Hinweis für diese Erklärung ist, dass die Osteolysen erst relativ spät im Verlauf des Heilungsprozesses auftreten und damit dem Konzept der frühen postoperativen Porose durch Stress Shielding widersprechen [78].

5.3.3 Zusammenfassung

Es ist unbestritten, dass eine Osteosynthese zur primären Stabilisierung eines segmentalen Defektes im belasteten Knochen zur Zeit unverzichtbar ist. Diese Funktion kann noch kein Scaffold erfüllen. Völlig unklar ist jedoch, wie ein ideales Design dieser Osteosynthese aussehen muss. Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass die Eigenschaften der Osteosynthese großen Einfluss auf das Wachstumsmuster des Knochens haben. So scheint vor allem die Beweglichkeit der Knochensegmente untereinander, die von der Rigidität der Osteosynthese abhängt, den Heilungsprozess zu beeinflussen. Anfangs wird der Knochen durch mechanische Stimuli zur Proliferation angeregt, was vor allem die Spangenbildung zeigt. Das es jedoch nicht zu einem Schluss der Segmente kommt, deutet daraufhin, dass diese Bewegung im späteren Stadium der Heilung eher kontraproduktiv war.

Bei der von uns verwendeten winkelstabilen Osteosynthese ist die Stabilität der Platte der entscheidende Parameter. Sie ist das last(über)tragende Element und von ihrer Verwindungssteife hängt es ab, wie stark Biegs- und Torsionskräfte zu Bewegung in der Osteotomie führen. Um Knochenheilung zu ermöglichen, sollten diese interfragmentären Bewegungen nicht komplett ausgeschaltet werden. Jedoch müssen sie soweit begrenzt werden, dass das Scaffold knöchern integriert und der knöcherne Schluss nicht behindert wird. Trotz einer sehr stabilen Platte aus der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie muss man feststellen, dass diese zu elastisch war, al-

so zu viele Bewegungen übertragen hat. Bei einer sehr steifen Platte besteht jedoch neben dem Plattenbruch die Gefahr, dass sie Torsions- und Biegekräfte ungefiltert an die Schrauben weiterleitet und damit die Schrauben-Knochen-Grenzfläche sehr viel stärker belasten würde.

Es müssen weitere Anstrengungen unternommen werden, um eine ideale Osteosynthese für das Modell des Defekts kritischer Größe zu entwickeln. Besonderes Augenmerk muss hier auf die interfragmentäre Beweglichkeit und damit auf die biomechanische Beeinflussung der Knochenheilung gelegt werden, vor allem auch was die knöcherne Integration des Scaffolds betrifft.

5.4 Wachstum und Scaffolds

Ein Ziel dieser Versuchsreihe war, die neu entwickelten Scaffolds in vivo zu evaluieren und herauszufinden, ob eine Besiedelung der Implantate mit MSCs einen Vorteil im Heilungsprozess ergibt.

5.4.1 Besiedelte vs. unbesiedelte Scaffolds

Im projektionsradiographischen Röntgen konnte kein Unterschied zwischen unbesiedelten und besiedelten Scaffolds festgestellt werden. Im μ -CT und in der Histologie konnte die Osteokonduktivität beider Implantate belegt werden, es fanden sich jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Zellbesiedelung und der Kalzifizierung, also der Osteoinduktivität und Osteogenität.

Osteokonduktivität

Osteokondiktivität wie von Davies und Hosseini [12] als das Bereitstellen und Einwandern von osteogenen Zellen in eine dreidimensionale, transiente Matrix definiert, ist eine Grundvoraussetzung für Tissue engineering von Knochen. Wie oben schon beschrieben, muss das Scaffold, um den Heilungsprozess zu unterstützen, knöchern einheilen. Dies kann, egal ob mit Zellen besiedelt oder nicht, nur geschehen, wenn vom bestehenden Knochen aus Knochen in das Scaffold einwächst und dieses somit integriert. Voraussetzung dafür ist das Einwandern von osteogenen Zellen in das Scaffold. Diese Zellen können aus dem Markraum, End- oder Periost oder von

perivaskulär kommen.

Wir konnten in der Histologie zeigen, dass bei unbesiedelten und besiedelten Implantaten Knochen von außen in das Scaffold wächst. Des weiteren konnten wir zumindest in der Peripherie der unbesiedelten Scaffolds Osteoblasten und Knochenmatrix nachweisen. Diese Ergebnisse belegen, dass eine Migration osteogener Zellen stattgefunden haben muss und zeigen die Osteokonduktivität der Scaffolds.

Zellbesiedlung und Kalzifizierung

Was auf Grund der im μ -CT nach vier Wochen signifikant höheren Dichte der mit MSCs besiedelten Scaffolds schon vermutet wurde, konnte mit der Histologie belegt werden: Nach vier Wochen waren nur bei den besiedelten Scaffolds Zellen im Scaffold-Zentrum darzustellen, auch die Zellbesiedlung in der Peripherie war deutlich höher als bei den unbesiedelten Scaffolds. Des weiteren konnte histologisch im gesamten Scaffold Knochenmatrixbildung nachgewiesen werden.

Daraus lässt sich schließen, dass bei gleicher Osteokonduktivität der unbesiedelten und besiedelten Scaffolds die Osteogenität durch die Besiedlung mit MSCs deutlich erhöht wurde. Also entsteht in den besiedelten Scaffolds schneller und mehr Knochen. Das wichtigste ist, dass auch im Zentrum des Scaffolds Knochen entsteht und dadurch der gesamte Defekt überbrückt werden könnte.

5.4.2 Degradation

Die Degradation eines Scaffolds hat maßgeblichen Einfluss auf den Erfolg der Knochenheilung. Degradiert das Implantat zu schnell kann es nicht als Gerüst dienen, degradiert es zu langsam behindert es den Knochen im Wachstum.

In fpvCT und μ -CT konnten Veränderungen des Scaffolds als Größen- und Strukturwechsel beobachtet werden. Es war jedoch nicht möglich, den Abbau der Kalziumphosphatphase des Scaffolds vom Aufbau von Knochenmatrix und den beiden Kalziumphosphatanteilen des Implantats zu unterscheiden. In der Histologie zeigte sich, dass der Kalziumphosphatanteil des Scaffolds abgebaut und durch Knochenmatrix auf dem PLGA-Gerüst ersetzt wurde. Nach 20 Wochen blieb vom ursprünglichen Scaffold nur noch das mit Knochen angefüllte PLGA-Gerüst übrig. Der Abbau des Kalziumphosphatanteils des Scaffolds konnte durch die Detritusbildung histologisch

belegt werden. Interessant ist, dass bei den besiedelten Scaffolds nach vier Wochen deutlich mehr Detritusbildung zu beobachten war.

Da es sich bei der Kalziumphosphatbeschichtung des Scaffolds um eine der mineralischen Phase des Knochens sehr ähnliche Verbindung handelt, sprechen manche Autoren bei solchen Scaffolds nicht von Degradation, sondern schon von Remodelling. Dies setzt jedoch vorhandene Osteoklasten voraus, die mit den Osteoblasten die BMUs (bone modelling units) bilden. Des weiteren muss die Signalkette und Osteozyten vorhanden sein, um einen zielgerichteten Umbau des Scaffold-Knochen-Konstruktes zu ermöglichen.

Auch wenn sich diese Theorie durch unsere Versuche nicht belegen ließ, zeigten die histologischen Untersuchungen, dass im mikroskopischen Bereich Aufbau von Knochen mit folgendem zielgerichteten Abbau des Kalziumphosphatanteils des Scaffolds und Ersatz durch neuen Knochen auf dem PLGA-Gerüst erfolgte. Dieser Prozess schien gut aufeinander abgestimmt zu sein. Warum aber fiel bei den zellbesiedelten Scaffolds eine größere Menge Detritus an? Dies lässt eine stärkeren Abbau des Scaffolds vermuten. Da sich nach vier und 20 Wochen in der Histologie und im μ -CT kein makroskopischer Unterschied in der Degradation der besiedelten und unbesiedelten Scaffolds zeigte, war diese Abbaudifferenz eher klein. Sie könnte durch die Besiedelung entstanden sein: Bei der Gewinnung der MSCs und Differenzierung der Osteoblasten kam es zu „Verunreinigung“ durch osteoklastäre Vorläuferzellen und so zu einer Besiedelung des Scaffolds auch mit Osteoklasten. Einen Nachteil hat dies nicht, vielleicht sogar den Vorteil, dass das Scaffold schneller mit Knochen durchwachsen werden kann.

Eine genaue Differenzierung der Kalziumphosphatphasen ist jedoch mit allen von uns angewandten Methoden nicht möglich, zur Differenzierung sollten noch weitere Untersuchungen, z.B. Spektraluntersuchungen wie die Raman-Spektroskopie durchgeführt werden.

Ein Unterschied in der Degradationskinetik ließ sich zwischen den Scaffolds „coated“ und den Scaffolds „coated and loaded“ im fpvCT beobachten. Bei den Implantaten mit der nanoporösen Kalziumphosphatbeschichtung (coated and loaded) schien der Abbauprozess radiologisch früher einzusetzen. Auf Grund der geringen Fallzahl konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Des weiteren konnte nach vier und 20 Wochen weder histologisch noch im μ -CT ein Unterschied darge-

stellt werden. Dies könnte jedoch daran liegen, dass die Unterschiede vor allem in der Zeit von 6 bis 12 Wochen postoperativ zu erkennen waren. Ein anderer Punkt ist, dass im μ -CT immer mehr Scaffold als im fpvCT dargestellt werden konnte. Das Scaffold also im fpvCT fortgeschrittener degradiert schien, als in vivo bis dahin erfolgt. So müssen weitere Versuche klären, ob es durch eine nanoporöse Beschichtung des Scaffolds und damit einer höheren Angriffsfläche zu einer schnelleren Degradation des Implantats kommt.

Da es nach 20 Wochen zu einer Non-Union bzw. in manchen Fällen zu keiner makroskopischen Integration des Scaffolds kommt, liegt die Frage auf der Hand, ob das Scaffold zu schnell degradiert und damit der Knochen keine Möglichkeit hat einzuwachsen. Die histologischen Untersuchungen vier Wochen postoperativ sprechen gegen eine solche Erklärung der Non-Union. Wie oben beschrieben konnten dort nämlich in das Scaffold einwachsender Knochen nachgewiesen werden. Also muss die Verbindung im Verlauf des Versuches unterbrochen worden sein. Dies kann biomechanische (siehe Abschnitt 5.3, Seite 77) oder wachstumsbedingte (siehe Abschnitt 5.4.5, Seite 90) Ursachen haben. Ein Abriss der Verbindung durch ein abruptes, schnelles Schrumpfen des Scaffold erscheint unwahrscheinlich, da es zu einer rapiden Verkleinerung des Implantats nicht kam.

5.4.3 Lufteinschlüsse und Infektionen

Die in der ersten fpvCT Untersuchung bei manchen Tieren beobachteten Lufteinschlüsse im Scaffold ließen den Verdacht auf eine Infektion zu. Glücklicherweise wurde keines der Tiere im Verlauf klinisch auffällig. In der folgenden fpvCT-Untersuchung zwei Wochen später (also vier Wochen postoperativ) konnten keine Lufteinschlüsse mehr nachgewiesen werden und es fanden sich auch keine Anzeichen für eine Infektion. Deswegen vermuten wir, dass die Luft während des Einsetzens des Scaffolds in die Poren gelangte und dann im Verlauf resorbiert bzw. abgebaut wurde. Wenn die Besiedelung im Bioreaktor mit großer Sorgfalt durchgeführt wird ist auch hier die Kontaminierung des Scaffolds mit Mikroorganismen unwahrscheinlich und eine mögliche Infektionsquelle ausgeschaltet. Die Operation verläuft unter sterilen Bedingungen und das Scaffold wird erst im Moment des Einsetzens aus dem verschlossenen Behälter mit Kulturmedium entnommen.

5.4.4 Gefäßproliferation

Bildung und Einwachsen von neuen Kapillaren und Gefäßen ist ein essentieller Baustein in der Frakturheilung. Nicht nur für das Einwachsen neuen Knochens, sondern auch für den Abtransport von Abbauprodukten (zum Beispiel des Scaffolds) ist eine Gefäßversorgung unerlässlich. Durch seine Größe kam es beim Critical Size Defect in der Vergangenheit oft zu einer zentralen Nekrose, da der zentrale Bereich des Defekts nicht genügend versorgt werden konnte. So wurde versucht, die Bildung von Gefäßen durch Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) anzuregen. Dies kann jedoch zu Fehlbildungen führen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine ausreichende Gefäßproliferation und damit auch Versorgung des Defektes und Scaffolds allein durch die Scaffoldkomposition und -Architektur erreicht wurden.

Unabhängig von der Zellbesiedelung der Scaffolds kam es in allen Versuchsgruppen zu Gefäßproliferationen. Diese konnten histologisch schon vier Wochen postoperativ nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 4.33 und 4.34, Seite 67 und 67). Des Weiteren kam es bei keinem Tier zu einer zentralen Nekrose oder sonstigen Ischämiezeichen. Also fördert diese Scaffoldart das Einwachsen von Gefäßen, dies ist sehr wichtig für die Osteokonduktivität und damit auch für die Osteogenität.

5.4.5 Periostales Wachstum

Einige Wachstumsmuster wie die Spangenbildung sind schon angesprochen worden. Auch die vermehrte Knochebildung im Osteotomiespalt direkt unter der Platte wurde schon diskutiert und auf die Leitschienenfunktion der Osteosynthesplatte zurückgeführt. Ein weiteres Phänomen ist das vom Periost ausgehende Knochenwachstum direkt am Osteotomiespalt, obwohl das Periost intraoperativ um den Osteotomiespalt entfernt wurde.

Vier Wochen postoperativ kommt es zu Knochenwachstum vom Periost ausgehend. Der Wachstumsprozess lässt sich in fpvCT und μ -CT und Histologie zeigen. Im Verlauf kommt es zu einem Umschlagen dieses Knochenbandes, es legt sich vor die Markräume und verschließt diese zu großen Teilen. Parallel dazu kommt es zu einer starken Verlangsamung der Knochenheilung, sie kommt praktisch zum Erliegen. Zwei Dinge sind bemerkenswert: Trotz Entfernung des Periosts geht augenscheinlich Wachstum von diesem aus und dieser Knochen legt sich vor die Markräume

und scheint die Knochenheilung im Osteotomiespalt zu behindern. Die Proliferation trotz Resektion spricht für das hohe osteogene Potential des Periosts. Die Entfernung sollte in Zukunft noch viel radikaler durchgeführt werden, wenn das Ziel die Ausschaltung dieses Prozesses sein soll.

Man sollte jedoch überlegen, ob man dieses Potential nutzen kann. So haben machen Gruppen den Defekt außerhalb des Scaffolds mit gestielten, andere mit herausgeschnittenen Periostlappen überbrückt und erzielten dabei gute Ergebnisse [63, 80]. Dieses Verfahren sichert die Verteilung von osteogenen Zellen Entlang der Osteotomie von außen. Auf jeden Fall verhindert werden muss das Umschlagen in den Osteotomiespalt und der daraus folgende Verschluss des Markraumes, da dies die Heilung des Defektes stark beeinträchtigt.

5.5 Non-Union

Wie schon mehrfach erwähnt, kam es zu keinem knöchernen Schluss der Osteotomie. Die Ursache ist entscheidend für die Bewertung dieses Konzeptes des scaffoldbasierten Tissue Engineering von Knochen in vivo. Auf Grund unserer Ergebnisse können mangelnde Gefäßversorgung, zu schnelle Scaffolddegradation, fehlende Osteokonduktivität oder Osteogenität und Infektion als Ursache ausgeschlossen werden. Auch die Besiedelung der Implantate mit Zellen führte zu keiner Veränderung dieser Problematik.

So bleiben zur Erklärung die teilweise fehlende knöcherne Integration des Scaffolds, die Osteosynhteseversorgung und der Verschluss des Markraumes durch Periostlappen. Die ausbleibende Verbindung der praktisch aneinander liegenden Knochenanastomosen ist sicherlich auf die erhöhte Beweglichkeit gegeneinander und somit auf die Osteosynthese zurückzuführen. Hier ist vor allem die hohe Biegebeanspruchung der Platte der entscheidende Punkt (siehe Abschnitt 5.3, Seite 77). Auch wird die Integration des Scaffolds durch die erhöhte Bewegung im Osteotomiespalt behindert. Besonders der knöcherne Einbau des Scaffolds ist ein weiterer mechanischer Stabilisator. Dieser Einbau ist aber auch von einem ungehinderten Zugang zum Markraum des Knochens als Quelle von osteogenen Zellen abhängig und dieser Zugang wird durch die vor den Markraum wachsenden Periostlappen verlegt. So ist sicherlich die Bildung von Kappen durch das Periost ein weiterer Grund für den ausbleibenden

knöchernen Schluss des Defekts. Es konnte radiologisch gezeigt werden, dass nach Ausbildung der Kappen der Heilungsprozess fast zum Stillstand kam.

Wir gehen davon aus, dass es durch mangelnde Stabilität der Osteosynthese, genauer der Biegebeanspruchung der Platte, zu einer Non-Union kam. Die vor allem im späteren Heilungsprozess entscheidende weitere Stabilisierung des Osteotomiespaltes durch einwachsenden Knochen und die Integration des Scaffolds wurde durch die vor Markraum und Anastomosen wachsenden Periostlappen verhindert. So trug die Periostlappenbildung auch zur Non-Union bei.

6

Folgerung

Die neu entwickelten Scaffolds sind sehr gut zum Tissue engineering von Knochen geeignet. Sie sind osteokonduktiv und mit MSCs besiedelt besitzen sie eine hohe Osteogenität, des weiteren unterstützen sie die Gefäßproliferation und es kommt zu keiner zentralen Nekrose. Es konnte gezeigt werden, dass die mit MSCs besiedelten Scaffolds schneller, mehr und auch zentral Knochen bilden und damit den unbesiedelten Scaffolds überlegen sind. Des weiteren ist die Besiedelung mit mesenchymalen Stammzellen eine Alternative zur Applikation von Wachstumsfaktoren. Zwischen den Scaffolds coated und den Scaffolds coated and loaded wurde kein entscheidender Unterschied festgestellt, nur im Degradationsverhalten scheint ein leichter Unterschied in der Kinetik zu bestehen. Die Degradation der Scaffolds erfolgt kontrolliert und es kommt zu keiner rapiden Schrumpfung im Verlauf der Anwendung. Sie sind intraoperativ gut handhabbar und lassen sich leicht in die Osteotomie einsetzen.

Dieser Versuchsaufbau zur in vivo Evaluation der Scaffolds hat zwei Nachteile: Eine adäquate Stabilisierung der Osteotomie ist sehr schwierig aber doch entscheidend

für den Heilungsprozess und die komplette Entfernung des Periosts ist sehr schwierig. Die winkelstabile Plattenosteosynthese ist der mit nicht geblockten Schrauben klar überlegen, die Bieungsbeanspruchung der Platte und damit die Bewegung der Fragmente gegeneinander bleibt ein zu lösendes Problem. Hier kann mit einer stärkeren Platte versucht werden, die Bewegung zu reduzieren. Allerdings hat dies den Preis der höheren Belastung der Schrauben. Die Periostlappenbildung behinderte in unserem Versuch den Heilungsprozess, kann diese aber bei gerichtetem Wachstum auch befördern. Also muss entweder das Periost radikal entfernt werden, oder das Einschlagen des Periosts vor die Anastomosen verhindert werden.

Alle von uns angewandten Untersuchungen konnten wichtige Erkenntnisse beitragen. Besonders das fpvCT als ein dreidimensionales, hochauflösendes in vivo Verfahren bietet sich als neue Möglichkeit für solche Versuchsreihen an, kann die postmortalen Verfahren aber nicht komplett ersetzen. Das μ -CT mit seiner sehr hohen Auflösung und die Histologie für die zelluläre Ebene tragen wichtige Details bei und sind so weiterhin essentiell zur postmortalen Auswertung dieser Versuche.

Um für eine klinische Studie in Frage zu kommen müssen die Scaffolds noch in größeren Tieren wie Schafen oder Hunden getestet werden. Des weiteren wäre eine Versuchsgruppe mit autologen mesenchymalen Stammzellen interessant, da dies beim Menschen die sicherste Anwendungsmöglichkeit wäre. Diese Versuche zeigen, dass die Besiedelung mit mesenchymalen Stammzellen eine lohnenswerte Alternative zu den Wachstumsfaktoren ist und weiterverfolgt werden sollte.

Tabellenverzeichnis

3.1	Stryker Leibinger Spezialbesteck	20
3.2	Narkosemedikamente	21
3.3	Entwässerung und Entfettung	29
3.4	Technovit 9100 Neu	30
3.5	Technovit 4000	32
4.1	Versuchsgruppen und Versuchszeiträume	38
4.2	Versuchszeiträume nach Scaffoldart	43
4.3	Degradationsverhalten der Scaffolds	51

Abbildungsverzeichnis

3.1	Osteosynthesystem der Firma Stryker	20
3.2	OP: Freigelegter Femur	22
3.3	OP: Angepasste Platte	23
3.4	OP: Fixierte Platte	23
3.5	OP: Implantat im Osteotomiespalt	24
3.6	Projektionsradiographische Kontrollaufnahme	25
3.7	Definition der anatomischen Schnittebenen	26
4.1	Projektionsröntgen: Scaffoldnachweis	39
4.2	Projektionsröntgen: Schraubenausriß	39
4.3	Projektionsröntgen: Knochenwachstum	40
4.4	Projektionsröntgen: Vermutlicher Defektschluss	41
4.5	fpvCT: Nummerierung der Schrauben	42
4.6	fpvCT: Darstellungsmöglichkeiten	44
4.7	fpvCT: Schattenartefakt der Platte	45
4.8	fpvCT: Artefakte durch Schrauben und Platte	45
4.9	fpvCT: Kleiner Haarriss	46
4.10	fpvCT: Schematische Darstellung des Osteosyntheseversagens	46
4.11	fpvCT: Osteosyntheseversagen durch Haarriss	47
4.12	fpvCT: Osteosyntheseversagen	48

4.13 fpvCT: Knochenabsplitterungen und Periostabhebung	48
4.14 fpvCT: Scaffold 2 Wochen postoperativ	49
4.15 fpvCT: Lufteinschlüsse im Scaffold	49
4.16 fpvCT: Scaffolddegradation	50
4.17 fpvCT: Knochenspangenbildung	53
4.18 fpvCT: Wachstumsverlauf	55
4.19 fpvCT: Sklerosen im Scaffold	56
4.20 fpvCT: Remodeling	57
4.21 $\mu - CT$: Scaffolds 4 Wochen postoperativ	59
4.22 $\mu - CT$: Scaffolds 12 bzw. 16 Wochen postoperativ	59
4.23 $\mu - CT$: Scaffolds 20 Wochen postoperativ	60
4.24 $\mu - CT$: Endostale und periostale Proliferation	61
4.25 $\mu - CT$: Knochenwachstum um Schraube und Mehrschalenbildung . .	61
4.26 $\mu - CT$: Fraglicher knöcherner Schluss des Defekts	62
4.27 Histologie: Zellbesiedeltes Scaffold	63
4.28 Histologie: Unbesiedeltes Scaffold	63
4.29 Histologie: Scaffolddegradation	64
4.30 Histologie: Knochenbildung im Scaffold	65
4.31 Histologie: Scaffolddegradation und Knochenneubildung im Scaffold .	65
4.32 Histologie: Knocheneinwuchs vom Endost in das Scaffold	66
4.33 Histologie: Knocheneinwuchs in das Scaffold	66
4.34 Histologie: Gefäße in Scaffoldmitte	67
4.35 Histologie: Intussuszeptionelle Gefäßbildung	67

Literaturverzeichnis

- [1] BABIS, C. G. ; SOUCACOS, P. N.: Bone Scaffolds: The Role of Mechanical Stability and Instrumentation. In: *Injury* 36 (2005), November, Nr. Suppl 4, S. S34–44
- [2] BARTHOLD, M. : *Züchtung primärer osteogener Zellen auf neuartigen Gerüststrukturen in Kleinfermentern zur Herstellung von Knochenimplantaten*, Technische Universität Braunschweig, Dissertation, 2003
- [3] *Kapitel 2: 3D-Cultivation and Characterisation of Osteogenic Cells for the Production of Highly Viable Bone Tissue Implants.* In: BARTHOLD, M. ; MAJORE, I. ; FARGALI, S. ; STAHL, F. ; SCHULZ, R. ; LOSE, S. ; MAYER, H. ; JÄGER, V. : *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Bd. 2. Springer Netherlands, 2005, S. 199–205
- [4] BESSA, P. C. ; CASAL, M. ; REIS, R. L.: Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road from laboratory to clinic, Part I (basic concepts). In: *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2 (2008), January, Nr. 1, S. 1–13
- [5] BESSA, P. C. ; CASAL, M. ; REIS, R. L.: Bone Morphogenetic Proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, Part II (BMP delivery). In: *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2 (2008), March–April, Nr. 2-3, S. 81–96
- [6] BOELLARD, J. W. ; HIRSCH, T. v.: Die Herstellung histologischer Schnitte von nicht entkalkten Knochen mittels Einbettung in Methacrylsäure-Ester. In: *Mikroskopie* 13 (1959), S. 386–391

-
- [7] BURKHARDT, R. : Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschliche Knochenmarks. 2.: Ein neues Verfahren zur histologischen Präparation von Biopsien aus Knochenmark und Knochen. In: *Blut* 14 (1966), S. 30–46
- [8] CASTANED, S. ; LARGO, R. ; CALVO, E. ; RODRIGUEZ-SALVANES, F. ; MARCOS, M. E. ; DÍAZ-CURIEL, M. ; HERRERO-BEAUMONT, G. : Bone Mineral Measurements of Subchondral and Trabecular Bone in Healthy and Osteoporotic Rabbits. In: *Skeletal Radiology* 35 (2006), January, Nr. 1, S. 34–41
- [9] CHEN, D. ; ZHAO, M. ; MUNDY, G. R.: Bone Morphogenetic Proteins. In: *Growth Factors* 22 (2004), December, Nr. 4, S. 233–241
- [10] CONCANNON, M. J. ; BROSCHE, M. T. ; PUCKETT, C. L.: Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: A long-term study. In: *Plastic and Reconstructive Surgery* 99 (1997), June, Nr. 7, S. 1983–1988
- [11] CONSTANTZ, B. R. ; ISON, I. C. ; FULMER, M. T. ; POSER, R. D. ; SMITH, S. T. ; VANWAGONER, M. ; ROSS, J. ; GOLDSTEIN, S. A. ; JUPITER, J. B. ; ROSENTHAL, D. I.: Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. In: *Science* 267 (1995), March, Nr. 5205, S. 1796–1799
- [12] DAVIES, J. E. ; HOSSEINI, M. M. ; DAVIES, J. E. (Hrsg.): *Bone Engineering*. Bd. 1. Elsevier Inc., 2000
- [13] *Kapitel 2*. In: DEBRUNNER, A. M.: *Orthopädie Orthopädische Chirurgie*. 4. Verlag Hans Huber, 2005
- [14] DONATH, K. : Die Trenn-Dünnschlifftechnik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. Apparate- und Methodenbeschreibung. 1987. – Forschungsbericht
- [15] DRESCHER, B. : *Einfluss unterschiedlicher Haltungsverfahren auf das Skelettsystem der Neuseeländer Fleischkaninchen und Chincilla-Bastard-Versuchskaninchen*, Freie Universität Berlin, Diss., 1989
- [16] EGOL, K. A. ; KUBIAK, E. N. ; FULKERSON, E. ; KUMMER, F. J. ; KOVAL, K. J.: Biomechanics of Locked Plates and Screws. In: *Journal of Orthopaedic Trauma* 18 (2004), September, Nr. 8, S. 488–493

-
- [17] ENGELKE, K. ; KAROLCZAK, M. ; LUTZ, A. ; SEIBERT, U. ; SCHALLER, S. ; KALENDER, W. : Mikro-CT. In: *Radiologe* 39 (1999), March, Nr. 3, S. 203–212
- [18] FARGALI, S. : *In vitro Etablierung eines Kaninchenmodells zur Herstellung von hochvitalen Knochenimplantaten auf Basis osteogener Zellen und bioresorbierbarer Trägergerüste*. Braunschweig, Germany, Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Diss., November 2006
- [19] *Kapitel 2. In Vitro Cultivation of Rabbit Mesenchymal Stromal Cells on 3D Bioresorbable Calcium Phosphate Scaffolds for the Generation of Bone Tissue Implants*. In: FARGALI, S. ; BARTHOLD, M. ; ROHDE, M. ; MAJORE, I. ; JÄGER, V. : *ESACT Proceedings*. Bd. 2: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Springer Netherlands, 2005, S. 241–243
- [20] FIALKOV, J. ; HOLY, C. ; SHOICHET, M. ; DAVIES, J. : In vivo bone engineering in a rabbit femur. In: *J Craniofac Surg*. 14 (2003), May, Nr. 3, S. 324–332
- [21] FILLMAN-HOLLIDAY, D. ; LANDY, M. S.: Animal Care Best Practices for Regulatory Testing. In: *ILAR Journal* 43 (2002), Nr. Supplement, S. S49–58
- [22] FULKERSON, E. ; EGOL, K. A. ; LIPORACE, F. ; KUMMER, F. J. ; KOVAL, K. J.: Fixation of Diaphyseal Fractures with a segmental Defect: A Biomechanical Comparison of Locked and Conventional Plating Technique. In: *Journal of Trauma* 60 (2006), April, Nr. 4, S. 830–835
- [23] GAUTIER, E. ; PERREN, S. M. ; GANZ, R. : Principles of Internal Fixation. In: *Injury* 6 (1992), October, Nr. 4, S. 220–232
- [24] *Kapitel Animal Models in Bone Disease*. In: GEDDES, A. D.: *Principles of Bone Biology*. Academic Press, 1996 (97), S. 1343–1354
- [25] GHILZON, R. ; CULLOCH, C. A. M. ; ZOHAR, R. : Stromal mesenchymal progenitor cells. In: *Leukemia Lymphoma* 32 (1999), January, Nr. 3-4, S. 211–221
- [26] GILSANZ, V. ; ROE, T. F. ; GIBBENS, D. T. ; SCHULZ, E. E. ; CARLSON, M. E. ; GONZALES, O. ; BOECHAT, M. I.: Effect of Sex Steroids on Peak Bone Density of Growing Rabbits. In: *American Journal of Physiology* 255 (1988), October, Nr. 4 Pt 1, S. E416–422

-
- [27] GOMES, M. E. ; GODINHO, J. S. ; TCHALAMOV, D. ; CUNHA, A. M. ; REIS, R. L.: Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties. In: *Materials Science and Engineering* (2002), Nr. C20, S. 19–26
- [28] GOODSHIP, A. E. ; CUNNINGHAM, J. L. ; KENWRIGHT, J. : Strain Rate and Timing of Stimulation in Mechanical Modulation of Fracture Healing. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355 (1998), October, Nr. Suppl, S. S105–S115
- [29] GOODSHIP, A. E. ; KENWRIGHT, J. : The Influence of Induced Micromovement Upon the Healing of Experimental Tibial Fractures. In: *Journal of Bone and Joint Surgery* 67 (1985), August, Nr. 4, S. 650–655
- [30] GRESCHUS, S. ; KIESSLING, F. ; LICHY, M. P. ; MOLL, J. ; MUELLER, M. M. ; SAVAI, R. ; ROSE, F. R. ; RUPPERT, C. ; GÜNTHER, A. ; LUECKE, M. ; FUSENIG, N. E. ; SEMMLER, W. ; TRAUPE, H. : Potential Applications of Flat-Panel Volumetric CT in Morphologic and Functional Small Animal Imaging. In: *Neoplasia* 7 (2005), August, Nr. 8, S. 730–740
- [31] GUAN, L. ; DAVIES, J. E.: Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold. In: *Journal of Biomedical Material Research* 71 (2004), December, Nr. 3, S. 480–487
- [32] GUEHENNEC, L. L. ; GOYENVALLE, E. ; AGUADO, E. ; HOCHMAND-CUNY, M. ; ENKEL, B. ; PILET, P. ; DACULSI, G. ; LAYROLLE, P. : Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 15 (2005), January, Nr. 72, S. 69–78
- [33] HEDBERG, E. L. ; KROESE-DEUTMAN, H. C. ; SHIH, C. K. ; LEMOINE, J. J. ; LIEBSCHNER, M. A. ; MILLER, M. J. ; YASKO, A. W. ; CROWTHER, R. S. ; CARNEY, D. H. ; MIKOS, A. G. ; JANSEN, J. A.: Methods: A Comparative Analysis of Radiography, Microcomputed Tomography and Histology for Bone Tissue Engineering. In: *Tissue Engineering* 11 (2005), September-October, Nr. 9-10, S. 1356–1367

-
- [34] HING, K. A.: Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? In: *Philosophical Transactions. Series A, mathematical, physical and engineering sciences* 362 (2004), December, Nr. 1825, S. 2821–2850
- [35] HOLLINGER, J. O. ; KLEINSCHMIDT, J. C.: The Critical Size Defect as an Experimental Model To Test Bone Repair Materials. In: *J Craniofac Surg* 1 (1990), January, Nr. 1, S. 60–68
- [36] *Kapitel In Vivo Models for Bone Tissue Engineering.* In: HOLY, C. E. ; FIALKOV, J. A. ; SHOICHET, M. S. ; DAVIES, J. E.: *Bone Engineering.* Em Squared Inc., 2000 (46), S. 496–503
- [37] HUISKES, R. ; RUIMERMAN, R. ; LENTHE, G. H. ; JANSSEN, J. D.: Effects of Mechanical Forces on Maintenance and Adaption of Form in Trabecular Bone. In: *Nature* 405 (2000), June, Nr. 8, S. 704–706
- [38] HUTMACHER, D. W. ; SCHANZ, J. T. ; LAM, C. X. F. ; TAN, K. C. ; LIM, T. C.: State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. In: *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 1 (2007), 260, Nr. 4, S. 245
- [39] INUI, K. ; MAEDA, M. ; SANO, A. ; FUJIOKA, K. ; YUTANI, Y. ; SAKAWA, A. ; YAMANO, Y. ; KATO, Y. ; KOIKE, T. : Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. In: *Calcified Tissue International* 63 (1998), December, Nr. 6, S. 490–495
- [40] JÄGER, V. ; BARTHOLD, M. : *Bioreactor for cultivating cells on a matrix.* December 2004
- [41] JAGODZINSKI, M. ; KRETTEK, C. : Effect of Mechanical Stability on Fracture Healing - an Update. In: *Injury* 38 (2007), March, Nr. Suppl 1, S. S3–S10
- [42] JONES, A. C. ; ARNS, C. H. ; SHEPPARD, A. P. ; HUTMACHER, D. W. ; MILTHORPE, B. K. ; KNACKSTEDT, M. A.: Assessment of Bone Ingrowth Into Porous Biomaterials Using Micro-CT. In: *Biomaterials* 28 (2007), May, Nr. 15, S. 2491–2504

-
- [43] JONES, J. R. ; LEE, P. D. ; HENCH, L. L.: Hierarchical porous materials for tissue engineering. In: *Philosophical Transactions. Series A, mathematical, physical and engineering sciences* 364 (2006), January, Nr. 1838, S. 263–281
- [44] KANCZLER, J. M. ; OREFFO, R. O.: Osteogenesis and Angiogenesis: The Potential of Engineering Bone. In: *European Cells Materials* 15 (2008), May, Nr. 2, S. 100–114
- [45] KARP, J. M. ; RZESZUTEK, K. ; SHOICHET, M. S. ; DAVIES, J. E.: Fabrication of precise cylindrical three-dimensional tissue engineering scaffolds for in vitro and in vivo bone engineering applications. In: *Journal of Craniofacial Surgery* 14 (2003), May, Nr. 3, S. 317–323
- [46] KHAN, Y. ; YASZEMSKI, M. J. ; MIKOS, A. G. ; LAURENCIN, C. T.: Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 90 (2008), February, Nr. Suppl 1, S. 36–42
- [47] KIESSLING, F. ; GRESCHUS, S. ; LICHY, M. P. ; BLOCK, M. ; FINK, C. ; VOSSELER, S. ; MOLL, J. ; MUELLER, M. M. ; FUSENIG, N. E. ; TRAUPE, H. ; SEMMLER, W. : Volumetric computed tomography (VCT): A new technology for noninvasive, high-resolution monitoring of tumor angiogenesis. In: *Nature Medicine* 10 (2004), October, Nr. 10, S. 1133–1136
- [48] KNESER, U. ; SCHÄFER, D. J. ; MUNDER, B. ; KLEMT, C. ; ANDREE, C. ; STARK, G. B.: Tissue engineering of bone. In: *Minimally Invasive Therapie and Allied Technologies* 11 (2002), May, Nr. 3, S. 107–116
- [49] KUBIAK, E. N. ; FULKERSON, E. ; STRAUSS, E. ; EGOL, K. A.: The Evolution of Locked Plating. In: *Journal of Bone and Joint Surgery* 88 (2006), December, Nr. Suppl 4, S. 189–200
- [50] LAURENCIN, C. T. ; KHAN, Y. ; KOFRON, M. ; EL-AMIN, S. ; BOTCHWEY, E. ; YU, X. ; COOPER, J. A.: The ABJS Nicolas Andry Award: Tissue Engineering of Bone and Ligament. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 446 (2006), June, S. 221–236

-
- [51] LEONOR, I. B. ; SOUSA, R. A. ; CUNHA, A. M. ; ZHONG, Z. P. ; GREENSPAN, D. ; REIS, R. L.: Novel starch thermoplastic/Bioglass composites: Mechanical properties, degradation behavior and in vitro bioactivity. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13 (2002), S. 939–945
- [52] LIU, X. ; MA, P. X.: Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. In: *Annals of Biomedical Engineering* 32 (2004), March, Nr. 3, S. 477–486
- [53] MANO, J. F. ; SOUSA, R. A. ; BOESEL, L. F. ; NEVES, N. M. ; REIS, R. L.: Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. In: *Composites Science and Technology* (2004), Nr. 64, S. 789–817
- [54] MARTINIAKOVÁ, M. ; OMELKA, R. ; CHRENEK, P. ; RYBAN, L. ; PARKÁNYI, V. ; GROSSKOPF, B. ; VONDRÁKOVÁ, M. ; BAUEROVÁ, M. : Changes of Femoral Bone Tissue Microstructure in Transgenic Rabbits. In: *Folia Biologica* 51 (2005), Nr. 5, S. 140–144
- [55] MOHATNY, A. K. ; MISRA, M. ; HINRICHSSEN, G. : Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. In: *Macromolecular Material Engineering* 276/277 (2000), S. 1–24
- [56] NARANG, R. ; LASKIN, D. M.: Experimental osteogenesis at fracture sites and gaps. In: *Journal of Oral Surgery* 34 (1976), March, Nr. 3, S. 225–231
- [57] NEWMAN, E. ; TURNER, A. S. ; WARK, J. D.: The Potential of Sheep for the Study of Osteopenia: Current Status and Comparison with other Animal Models. In: *Bone* 16 (1995), April, Nr. 4 Suppl, S. 277S–284S
- [58] NIEDHART, C. ; PINGSMANN, A. ; JÜRGENS, C. ; MARR, A. ; BLATT, R. ; NIETHARD, F. : Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm - eine prospektive, kontrollierte Studie. In: *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 141 (2003), S. 481–486
- [59] OBENHAUER, S. ; DULLIN, C. ; ALVES, F. ; MISSBACH-GUENTNER, J. ; GRABBE, E. ; HEUSER, M. : Flat-panel-detector-based volumetric CT: performance evaluation of imaging for skeletal structures of small animals in comparison to multislice CT. In: *Clinical Imaging* 31 (2007), January, Nr. 1, S. 18–22

-
- [60] OBERT, M. ; AHLEMEYER, B. ; BAUMGART-VOGT, E. ; TRAUPE, H. : Flat-Panel Volumetric Computed Tomography A New Method for Visualizing Fine Bone Detail in Living Mice. In: *Journal of Computer Assisted Tomography* 29 (2005), July/August, Nr. 4, S. 560–565
- [61] OEST, M. E. ; DUPONT, K. M. ; KONG, H. J. ; MOONEY, D. J. ; GULDBERG, R. E.: Quantitative Assessment of Scaffold and Growth Factor-Mediated Repair of Critically Sized Bone Defects. In: *Journal of Orthopaedic Research* 25 (2007), July, Nr. 7, S. 941–950
- [62] PERREN, S. M.: Physical and Biological Aspects of Fracture Healing with Special Reference to Internal Fixation. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 138 (1979), January-February, Nr. 1, S. 175–196
- [63] PERROT, P. ; HEYMANN, D. ; CHARRIER, C. ; COUILAUD, S. ; REDINI, F. ; DUTEILLE, F. : Extrasosseous Bone Formation Obtained by Association of Mesenchymal Stem Cells with a Periosteal Flap in the Rat. In: *Annals of Plastic Surgery* 59 (2007), August, Nr. 2, S. 201–206
- [64] Kapitel 25. In: PLENK, H. : *Reineis Mikroskopische Technik*. 17. Peter Böck, 1989, S. 527–557
- [65] RADICE, M. ; BRUN, P. ; CORTIVO, R. ; SCAPNELLI, R. ; BATTALIARD, C. ; ABATANGELO, G. : Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. In: *Journal of Biomedical Material Research* 50 (2000), S. 101–109
- [66] REICHARDT, B. ; SARWAR, A. ; BARTLING, S. H. ; CHEUNG, A. ; GRASRUCK, M. ; LEIDECKER, C. ; BREDELLA, M. A. ; BRADY, T. J. ; GUPTA, R. : Musculoskeletal Applications of flat-panel volume CT. In: *Skeletal Radiology* 37 (2008), December, Nr. 12, S. 1069–1076
- [67] REZWAN, K. ; CHEN, Q. Z. ; BOCCACCINI, J. J. B. A. R.: Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. In: *Biomaterials* 27 (2006), June, Nr. 18, S. 3413–3431
- [68] ROSE, F. R. ; OREFFO, R. O.: Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 (2002), March, Nr. 1, S. 1–7

-
- [69] SALGADO, A. J. ; COUTINHO, O. P. ; REIS, R. L.: Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. In: *Macromolecular Bioscience* 4 (2004), August, Nr. 8, S. 743–765
- [70] SCHAAF, H. ; STRECKBEIN, P. ; OBERT, M. ; GOERTZ, B. ; CHRISTOPHIS, P. ; HOWALDT, H. P. ; TRAUPE, H. : High Resolution Imaging of Craniiofacial Bone Specimens by flat-panel volumetric Computed Tomography. In: *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 36 (2008), June, Nr. 4, S. 234–238
- [71] SCHENK, R. K.: Zur histologischen Verarbeitung von unentkalktem Knochen. In: *Acta anatomica* 60 (1965), S. 3–19
- [72] SCHMITZ, J. P. ; HOLLINGER, J. O.: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1986), April, Nr. 205, S. 299–308
- [73] SEAL, B. : Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. In: *Materials Science and Engineering: R: Reports* 34 (2001), October, Nr. 4-5, S. 147–230
- [74] SOLCHAGA, L. A. ; DENNIS, J. E. ; GOLDBERG, V. M. ; CAPLAN, A. I.: Hyaluronic Acid-Based Polymers as Cell Carriers for Tissue-Engineered Repair of Bone and Cartilage. In: *Journal of Orthopaedic Research* 17 (1999), S. 205–213
- [75] STOFFEL, K. ; DIETER, U. ; GÄCHTER, G. S. A. ; KUSTER, M. S.: Biomechanical Testing of the LCP - how can Stability in Locked Internal Fixators be Controlled. In: *Injury* 34 (2003), November, Nr. Suppl 2, S. B11–19
- [76] STRAUSS, E. J. ; SCHWARZKOPF, R. ; KUMMER, F. ; EGOL, K. A.: The Current State of Locked Plating: The Good, the Bad and the Ugly. In: *J Orthop Trauma* 22 (2008), August, Nr. 7, S. 479–486
- [77] TROJANI, C. ; BALAGUER, T. ; BOUKHECHBA, F. ; CARLE, G. F. ; BOILEAU, P. ; ROCHET, N. : Cellular strategies in Bone Tissue Engineering: A Review. In: *Revue de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'appareil moteur* 94 (2008), February 2008, Nr. 1, S. 1–11

-
- [78] UTHOFF, H. K. ; POITRAS, P. ; BACKMAN, D. S.: Internal PLate Fixation: Short History and Recent Developments. In: *Journal of Orthopaedic Science* 11 (2006), March, Nr. 2, S. 118–126
- [79] VACANTI, C. A.: The history of tissue engineering. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10 (2006), July, Nr. 3, S. 569–576
- [80] VÖGELIN, E. ; JONES, N. F. ; HUANG, J. I. ; BREKKE, J. H. ; LIEBERMANN, J. R.: Healing of a Critical-Sized Defect in the Rat Femur with use of a Vascularized Periosteal Flap, a Biodegradable Matrix, and Bone Morphogenetic Proteins. In: *Journal of Bone and Joint Surgery* 87 (2005), June, Nr. 6, S. 1323–1331
- [81] WANG, X. ; MABREY, J. D. ; AGRAWAL, C. M.: A INterspecies Comparison of Bone Fracture Poperties. In: *Bio-Medical Materials and Engineering* 8 (1998), January, Nr. 1, S. 1–9
- [82] WEINAND, C. ; GUPTA, R. ; WEINBERG, E. ; MADISCH, I. ; NEVILLE, C. ; JUPITER, J. B. ; VACANTI, J. : Towards Regenerating a Human Thumb in Situ. In: *Tissue Engineering Part A* Epub ahead of print (2009), February
- [83] YOON, S. J. ; PARK, K. I. ; KIM, M. S. ; RHEE, J. M. ; KHANG, G. ; LEE, H. B.: Repair of Diaphyseal Bone Defects with Calcitriol-Loaded PLGA Scaffolds and Marrow Stromal Cells. In: *Tissue Engineering* 12 (2007), May, Nr. 5, S. 1125–1133
- [84] YOUNG, R. W.: Cell proliferation specialization during enchondral osteogenesis in young rats. In: *The Journal of Cell Biology* 14 (1962), September, S. 357–370
- [85] ZHANG, Y. ; NI, M. ; ZHANG, M. ; RATNER, B. : Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. In: *Tissue Engineering* 9 (2003), April, Nr. 2, S. 337–345
- [86] ZHANG, Y. ; ZHANG, M. : Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. In: *Journal of Biomedical Material Research* 55 (2001), S. 304–312

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projektes „Biokompatibilitätsuntersuchung von 222-07A-F nach Implantation in den Kaninchenknochen für 4 und 26 Wochen“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. ing. Ralf-Peter Franke durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Franke und Frau Dr. Rosemarie Fuhrmann möchte ich für die Realisierung dieses Projektes, die wissenschaftlich Beratung und Betreuung, die Hilfe bei der Auswertung und die Korrektur der Arbeit danken.

Marita Kratz, PD Dr. med. Stefan Endres, vielen, vielen Dank, ohne Euch hätte es nicht funktioniert. Ihr habt durch Euren großen Einsatz während der experimentellen Phase und danach, Eure Geduld und Eure bedingungslose Unterstützung alles erst möglich gemacht.

Für die Leitung des Projektes am Standort Marburg möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Axel Wilke sehr herzlich danken.

Großer Dank gebührt Prof. Dr. David Jones von der Abteilung für Experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, für das zur Verfügung stellen der Labore und intensive unterstützen der Arbeit.

Für die Unterstützung der tierexperimentellen Phasen geht mein Dank an Guido Schemken (Leiter der Versuchstierhaltung, Philipps-Universität Marburg) und sein Team.

Vielen Dank an Dr. met. vet. Bernhard Hiebl (GKSS Berlin) für wissenschaftliche und praktische Beratung.

Für die Durchführung der Projektionsradiologischen Untersuchung vielen Dank an PD Dr. med Marc Kalinowski (Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg).

Dr. rer. nat. Martin Obert und Kathrin Respondek gebührt für die Durchführung der fpvCT-Untersuchungen und die Hilfe bei der Auswertung mein großer Dank. Ebenso Prof. Dr. med. Horst Traupe für das freundliche zur Verfügung stellen des fpvCTs und seiner Einrichtungen (alle Klinik für Neuroradiologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen).

Dr. med. Jörg Egbring (Klinik für Diagnostische Radiologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen) vielen Dank für die Unterstützung beim *mu*-CT.

Philip Völkel vielen Dank für die Unterstützung bei der Literaturrecherche.

Vielen Dank an meine Familie, meine Eltern, Dres. Sigrid und Walter Hägele und Schwestern Claudia, Carolin und Gundula, für die immerwährende Unterstützung.

Marlen, vielen lieben Dank, für alles.

Zuletzt natürlich vielen herzlichen Dank an Christian Beltzer. Nur zusammen konnten wir diese Arbeiten schaffen, alleine wäre das wohl sehr schwierig geworden. Vielem Dank für die Unterstützung, Zusammenarbeit und viele unterhaltsamen Stunden.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten:

In Marburg: Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Becker, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Dietrich, Ellenrieder, Endres, Feuser, Görg, Grau, Gress, Grimm, Griss, Gotzen, Hertel, Hoffmann, Hoyer, Kalinowski, Klose, Koolman, Kuhlmann, Langer, Lill, Löffler, Maisch, Mandrek, Max, Meyer, Moll, Mueller, Müller, Oertel, Neubauer, Renz, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Seitz, Steiniger, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, Zielke.

In Hamburg: Lehmann, Rehder, Rueger.

In Kapstadt: Pretorius, Vlok.